

DORIVAL MORESCHI JUNIOR

**EFEITOS DA PROSTAGLANDINA E₁ NA GÊNESE DE CAPILARES
SANGUÍNEOS EM MÚSCULO ESQUELÉTICO ISQUÊMICO DE
RATOS: ESTUDO HISTOLÓGICO E ULTRA-ESTRUTURAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

**SÃO PAULO
2006**

DORIVAL MORESCHI JUNIOR

**EFEITOS DA PROSTAGLANDINA E₁ NA GÊNESE DE CAPILARES
SANGUÍNEOS EM MÚSCULO ESQUELÉTICO ISQUÊMICO DE
RATOS: ESTUDO HISTOLÓGICO E ULTRA-ESTRUTURAL**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

ORIENTADOR: Prof. Dr. Djalma José Fagundes

**SÃO PAULO
2006**

Moreschi Junior, Dorival

Efeitos da Prostaglandina E₁ na gênese de capilares sanguíneos em músculo esquelético isquêmico de ratos: estudo histológico e ultra-estrutural /Dorival

Moreschi Junior – São Paulo, 2006.

xvii, 47f

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação.

Effects of Prostaglandin E₁ in the genesis of blood capillaries in the ischemic skeletal muscle of rats: histological study and ultra-structural analysis.

1. Angiogênese 2. Vasculogênese 3. Isquemia 4. Prostaglandina 5. Ratos



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
UNIFESP-EPM

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIRURGIA E EXPERIMENTAÇÃO
COORDENADOR: Prof. Dr. José Luiz Martins

TESE DE DOUTORADO

AUTOR: Dorival Moreschi Junior

ORIENTADOR: Prof. Dr. Djalma José Fagundes

TÍTULO: Efeitos da Prostaglandina E₁ na gênese de capilares sanguíneos em músculo esquelético isquêmico de ratos: estudo histológico e ultra-estrutural.

BANCA EXAMINADORA

1 – Presidente: Prof. Dr. Djalma José Fagundes

Professor Adjunto da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da UNIFESP – EPM.

MEMBROS EFETIVOS

2 – Prof. Dr. José Manoel da Silva Silvestre

Professor Associado da Disciplina de Angiologia e Cirurgia Vascular do Departamento de Cirurgia da Universidade Estadual de Londrina.

3 – Prof. Dr. José Carlos Costa Baptista-Silva

Professor Associado Livre-Docente da Disciplina de Angiologia e Cirurgia Vascular do Departamento de Cirurgia da UNIFESP – EPM.

4 – Prof. Dr. Carlos Edmundo Rodrigues Fontes

Professor Adjunto da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental do Departamento de Medicina da Universidade Estadual de Maringá.

5 – Prof. Dr. Ricardo Luiz Smith

Professor Adjunto da Disciplina de Anatomia Descritiva e Topográfica do Departamento de Morfologia da UNIFESP-EPM.

MEMBROS SUPLENTE

1 – Prof. Dr. Murched Omar Taha

Professor Livre Docente da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da UNIFESP – EPM

2 – Prof. Dr. João Francisco Filho

Professor Adjunto da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia da UNIFESP – EPM.

Salmo 133

*“Oh ! Quão bom e quão suave
é que os irmãos vivam em união !
É como o óleo precioso sobre a cabeça,
que desce sobre a barba, a barba de Arão,
e que desce à orla de suas vestes;
como o orvalho de Hermom,
que desce sobre os montes de Sião;
porque ali o Senhor ordena a bênção
e a vida para sempre”.*

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Dorival Moreschi** (*in memorian*) e **Lucilia Marchesi Moreschi**, pela educação simples, mas de bons princípios, que a mim foi dada.

À minha amada esposa, **Lessi Karling**, que é o suporte de todas as minhas lutas e conquistas, companheira fiel e dedicada em todos os momentos, mãe exemplar.

Aos meus filhos, **Denys, Luma, Lívia e Diogo**, razão principal da minha vida.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao **Prof. Dr. Djalma José Fagundes**, Professor Adjunto da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (UNIFESP - EPM), pelo apoio, paciência, confiança e orientação na confecção e, principalmente, correção deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Luzmarina Hernandez**, Professora Adjunto do Departamento de Ciências Morfofisiológicas da Universidade Estadual de Maringá (UEM), pela amizade e auxílio na execução dos Procedimentos Histológicos e na redação deste trabalho.

À **Prof. Dra. Edna Haapalainen**, do Centro de Microscopia Eletrônica da UNIFESP-EPM, pelo carinho com que me acolheu e pela orientação, execução e interpretação da microscopia eletrônica.

Aos médicos **Hugo Meister e Mônica Cristina B. M. Oliveira**, Patologistas do Laboratório de Patologia Maringá (LAPAM), pelo apoio pessoal e estrutural na realização do estudo imuno-histoquímico.

À **Profa. Dra. Ciomar Aparecida Bersani Amado**, Professora Adjunto do Departamento de Farmacologia da UEM, por ceder seu laboratório de experimentação e o biotério setorial, além do apoio em todas as etapas deste trabalho.

À **Profa. Dra. Marilda da Cruz Fernandes**, Professora Adjunto do Departamento de Histologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, pela orientação e auxílio na metodologia do estudo imuno-histoquímico.

Ao **Acadêmico de Medicina da UEM Eduardo Bersani Amado**, pelo apoio na fase experimental e auxílio nos procedimentos histológicos.

A **Estaticista Sra. Sandra Malagutti**, pela orientação na análise estatística.

Aos **Técnicos e Auxiliares de Laboratório da UEM, Sr. Jailson Araújo Dantas, Sra. Célia Regina Miranda, Sra. Maria Euride Carlo Cancino, e Sra. Maria dos Anjos Fortunato**, pelo auxílio nas atividades práticas deste experimento.

Ao **Técnico do LAPAM Sr. Devair Santana**, pelo auxílio nos procedimentos técnicos da imuno-histoquímica.

A toda **Equipe do Centro de Microscopia Eletrônica da UNIFESP-EPM, Prof. Dr. Flávio Paulo de Faria, Sra. Márcia Tanakai, Sra. Maria Isabel dos Santos, Sr. André Aguilera, Sra. Patrícia Milanez**, pelo empenho e dedicação com que exercem suas funções.

Às Sras. **Valdelice Justiniano Soares e Elaine Maria Alves Bazzi Dantas**, secretárias do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação da UNIFESP, pelo cordial e eficiente atendimento a mim dispensados.

À **Universidade Estadual de Maringá**, agradeço o fornecimento de infra-estrutura para realização do experimento.

À **Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina**, pela oportunidade de poder participar deste Programa de Pós-Graduação de alto nível técnico-científico.

Ao **Laboratório Biossintética** pelo fornecimento do medicamento Alprostadil®.

A todos de **minha família** pelo incentivo e compreensão de minhas ausências.

A todos os **meus amigos** pelo apoio.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01 - Fluxograma mostrando a distribuição dos animais nos grupos Isquêmicos (I), com o uso da PGE₁ Intramuscular (IM) e com o uso da PGE₁ Endovenoso (EV) e nos respectivos subgrupos aos sete e quatorze dias de observação..... 07
- Figura 02 - Fotografias da região medial do membro caudal direito de rato, após a incisão da pele e tela subcutânea, mostrando: (2A) a disposição do feixe vâsculo-nervoso (N = nervo; A = artéria; V = veia) com destaque para a artéria femoral (seta); (2B) o isolamento e a ligadura distal da artéria femoral..... 09
- Figura 03 - Fotografias mostrando: (3A) os quatro pontos de injeção IM (*) na região medial do membro caudal do animal; (3B) administração EV em veia dorsal do pênis do animal..... 10
- Figura 04 – Fotografia mostrando a peça retirada para o processamento histológico, composta de um segmento da parte medial do membro caudal que englobou tecidos musculares e o feixe vâsculo-nervoso, sem a presença da artéria femoral..... 11

- Figura 05 - Fotomicrografias em microscopia de luz de músculo esquelético de rato mostrando: (5A) a presença de núcleos periféricos (*) nas células musculares em rato do subgrupo Isquêmico observado aos 7 dias (HE, 100x); (5B) os capilares sanguíneos (seta) e núcleo (*) em rato do subgrupo com uso da PGE₁ IM observado aos 14 dias (HE, 1000x); (5C) presença de núcleos centrais (*) e grande quantidade de capilares e vasos maiores (setas) em rato do subgrupo com uso da PGE₁ EV observado aos 14 dias (HE, 960x). M = células musculares; C = fibras colágenas..... 16
- Figura 06 Fotomicrografias em microscopia de luz de músculo esquelético de rato mostrando: (6A), hemácias (H) dentro dos capilares maiores e entre as células musculares (seta), em rato do subgrupo com uso da PGE₁ EV observado aos 14 dias (Toluidina, 960x); (6B) vários capilares (setas) em rato do subgrupo com uso da PGE₁ IM observado aos 14 dias (Toluidina, 960x). M = células musculares..... 17
- Figura 07 - Fotomicrografias em microscopia de luz de músculo esquelético de um animal do subgrupo com uso da PGE₁ IM observado aos 14 dias, mostrando a marcação de capilares através da imuno-histoquímica (setas), utilizando o anticorpo CD 34..... 19
- Figura 08 - Fotomicrografia de músculo esquelético de um animal do subgrupo com uso da PGE₁ EV observado aos 14 dias, mostrando a marcação (seta) de um vaso maior e de um capilar pela técnica de imuno-histoquímica, utilizando o anticorpo VEGF, ambos presentes entre as fibras colágenas do tecido conjuntivo..... 20

- Figura 09 - Eletromicrografia do músculo esquelético de um rato do subgrupo Isquêmico observado aos 7 dias. Observa-se um capilar com hemácia (H) em sua luz (L), com o núcleo denso da célula endotelial (N) e um pericito (PE) em sua borda superior. M = células musculares, C = fibras colágenas..... 21
- Figura 10 - Eletromicrografia do músculo esquelético de um rato do subgrupo com o uso da PGE₁ EV observado aos 14 dias. Nota-se um capilar sanguíneo em formação a partir de duas células endoteliais (CE1 e CE2), com núcleo (N) denso em apenas uma, que abrem espaço entre elas formando a luz (L) do capilar. M = células musculares; C = fibras colágenas; MB = membrana basal; JC junção celular..... 22
- Figura 11 - Eletromicrografia do músculo esquelético de um rato do subgrupo com uso da PGE₁ EV observado aos 14 dias. O capilar sanguíneo (CA) é formado por três células endoteliais (CE) unidas por junções celulares (JC); pequenos filopódios (setas) são observados na superfície luminal do capilar. Um provável pericito (PE) e diversos fragmentos de citoplasma de outros, encontra-se próximo ao capilar. M = células musculares, C = fibras colágenas..... 22
- Figura 12 - Eletromicrografia do músculo esquelético de um rato do subgrupo com o uso da PGE₁ IM observado aos 14 dias. Nota-se um capilar sanguíneo formado por três células endoteliais (CE1, CE2, CE3) unidas por junções celulares (JC), com núcleo denso em apenas uma (N). PE = pericito, H = hemácias, M = células musculares..... 23

- Figura 13 - Eletromicrografia do músculo esquelético de um rato do subgrupo com o uso da PGE₁ IM observado aos 14 dias. Nota-se um capilar sanguíneo formado por duas células endoteliais (CE1 e CE2), com núcleo denso (N) em apenas uma, provavelmente em final de mitose e vários filopódios (setas) em sua superfície luminal. Na borda superior provável brotamento (B) do capilar com membrana basal difusa. PE = pericito; M = células musculares; ME = matriz extracelular; JC = junção celular..... 23
- Figura 14 - Eletromicrografia do músculo esquelético de um rato do subgrupo com o uso da PGE₁ IM observado aos 14 dias. Nota-se um capilar sanguíneo em formação com núcleo denso (N) em apenas uma das duas células endoteliais (CE1 e CE2). PE = pericito; M = células musculares; JC = junção celular; MO = células mononucleares..... 24
- Figura 15 - Eletromicrografia do músculo esquelético de um rato do subgrupo com o uso da PGE₁ IM observado aos 14 dias. Nota-se um capilar sanguíneo formado por célula endotelial com núcleo denso (N) e o lúmen (L) dividido em duas partes por uma ponte (PO) de citoplasma de células endoteliais. PE = pericito; H = hemácia; JC = junção celular; M = células musculares..... 24

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Média, erro-padrão da média, mediana e números mínimo e máximo da contagem de capilares em H-E nos diferentes grupos avaliados.....	17
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01 -	Número de capilares sanguíneos quantificados no músculo isquêmico de membro caudal de ratos. Valores representam a média \pm erro padrão da média. $p < 0.05$ quando comparados os seguintes subgrupos: (A) IM-7 x IM-14; (B) EV-7 x EV-14; (C) I-14 x IM-14 e (D) I-14 x EV-14.....	18
--------------	--	----

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

cm = centímetro(s)

h = hora(s)

Kg = quilograma

mg.Kg⁻¹ = miligrama(s) por quilograma

ml = mililitro

ml.Kg⁻¹ = mililitro(s) por quilograma

ml.min⁻¹ = mililitro(s) por minuto

mm² = milímetro quadrado(s)

mm = milímetro(s)

G = Gaule

N = número total de animais

n = número de animais em cada subgrupo

I = grupo isquêmico

I-7 = grupo isquêmico com 7 dias de pós-operatório

I-14 = grupo isquêmico com 14 dias de pós-operatório

IM-7 = grupo isquêmico com uso de PGE1 intramuscular e 7 dias de pós-operatório

IM-14 = grupo isquêmico com uso de PGE1 intramuscular e 14 dias de pós-operatório

EV-7 = grupo isquêmico com uso de PGE1 endovenoso e 7 dias de pós-operatório

EV-14 = grupo isquêmico com uso de PGE1 endovenoso e 14 dias de pós-operatório

U/L = unidade por litro

PGE₁ = Prostaglandina E 1

MET = Microscopia Eletrônica de Transmissão

CEME = Centro de Microscopia Eletrônica da UNIFESP - EPM

UEM = Universidade Estadual de Maringá

UNIFESP – EPM = Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina

RESUMO

Objetivo: o objetivo deste trabalho foi estudar os aspectos morfológicos e ultra-estruturais na gênese de capilares sanguíneos em músculo esquelético do membro caudal de ratos submetidos à isquemia sob a ação da Prostaglandina E1 (PGE_1), administrada por via intramuscular ou endovenosa. **Métodos:** foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), linhagem Wistar-UEM, distribuídos aleatoriamente em três grupos de 20, redistribuídos igualmente em dois subgrupos, observados no 7º e 14º dias, sendo um grupo controle onde apenas foi provocada a isquemia no membro, outro com a isquemia e a injeção da PGE_1 via intramuscular (IM), e outro com a isquemia e a injeção da PGE_1 endovenosa (EV). Para análise dos resultados, foram realizadas a coloração com hematoxilina & eosina (HE), a imuno-histoquímica e a microscopia eletrônica de transmissão (MET). **Resultados:** constatou-se um aumento estatisticamente significativo no número de capilares nos subgrupos com o uso da PGE_1 IM e EV, através da contagem nos cortes corados com HE. Houve marcação de capilares e vasos de maior calibre nestes mesmos subgrupos, porém, esta reação não foi eficiente para a quantificação dos capilares. Na MET encontraram-se evidências de formação de novos capilares. **Conclusões:** a PGE_1 , administrada por via IM ou EV, promoveu, após 14 dias de observação, um aumento no número de capilares no músculo esquelético de ratos submetido à isquemia, identificáveis histologicamente com a coloração em HE. Na análise ultra-estrutural encontraram-se alterações que sugerem, nos animais sob a ação da PGE_1 , que a neoformação vascular possa ter ocorrido por angiogênese e vasculogênese. A imuno-coloração, apesar da marcação de capilares e vasos maiores, não permitiu estabelecer uma correlação com o aumento de vasos encontrados na coloração com HE.

ABSTRACT

Objective: The objective of this work was to study the morphologic and ultra-structural aspects in the genesis of blood capillaries in the lower limb skeletal muscle of rats submitted to ischemia under the action of intramuscular or endovenous Prostaglandin E1 (PGE₁).

Methods: Sixty Wistar-UEM rats (*Rattus norvegicus albinus*) were used, randomly distributed into three groups of 20, equally redistributed into two subgroups, observed at the 7th and 14th days as follows: group only with ischemia was considered as control (C), group with ischemia and intramuscular injection of PGE₁ (IM), and group with ischemia and endovenous injection of the PGE₁ (EV). The analysis of results was performed with the HE staining, imuno-histochemistry and transmission electronic microscopy (TEM).

Results: an increase statistically significant was verified in the number of capillaries in the subgroups with PGE₁ using IM or EV, through the counting in the samples with HE staining. Demarcation of capillaries and larger vases in these subgroups were observed, however, this reaction was not efficient for the quantification of the capillaries. In the electronic microscopy, evidences of new capillary formation were found.

Conclusions: intramuscular or endovenous PGE₁ promoted an increase on the number of capillaries in the skeletal muscle of rats submitted to ischemia after 14 days of observation histologically identifiable through HE staining. In the ultra-structural analysis, alterations found suggest, for animals under the action of PGE₁ that the vascular neoformation might have occurred through angiogenesis and/or vasculogenesis. The imuno-staining, despite the demarcation of capillary and larger vases, did not allow the establishment of a correlation with the increase of vases found in the HE staining.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. MÉTODOS	6
4. RESULTADOS	15
5. DISCUSSÃO	25
6. CONCLUSÕES	36
7. REFERÊNCIAS	37
8. NORMAS ADOTADAS	43
APÊNDICE	44

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde conceitua aterosclerose como uma afecção resultante de "... uma combinação de alterações da íntima das artérias consistindo numa acumulação focal de lipídeos, hidratos de carbono complexos, sangue e produtos sangüíneos, tecido fibroso e depósitos de cálcio, acompanhada de alterações da camada média"¹.

A aterosclerose é a causa principal da doença arterial oclusiva dos membros inferiores, seguida pelas doenças arteriais de causas inflamatórias. Apesar da divulgação e aplicação de medidas preventivas tais como: controle da hipertensão arterial, do diabetes melito, das dislipidemias e das restrições ao uso do tabaco, continua sendo uma das principais causas de mortalidade e morbidade em humanos^{1,2,3}.

Muitos pacientes, devido ao grave comprometimento do leito arterial primitivo, podem não apresentar resposta satisfatória ao tratamento clínico (medicamentoso). Por outro lado, é comum não apresentarem condições clínico-cirúrgicas para alternativa operatória de revascularização direta ou angioplastia^{2,4}. O tratamento nestas condições é normalmente paliativo e com resultados limitados.

As conseqüências de uma isquemia muscular aparecem quando o suprimento de oxigênio não é suficiente para manter as necessidades metabólicas requeridas, determinando o quadro clínico de claudicação intermitente, que progressivamente poderá evoluir para claudicação limitante, dor em repouso e gangrena^{1,3,5}.

A claudicação intermitente é uma doença incapacitante que afeta 5% da população acima dos 50 anos de idade. Os sintomas progridem em 25% dos pacientes, sendo que 5-7% necessitarão de uma amputação dentro de cinco anos, e o óbito por infarto agudo do miocárdio ou isquemia aguda do membro é muito comum entre eles^{3,4}.

A diminuição da perfusão nos músculos periféricos estimula o desenvolvimento de circulação colateral para suprir a perda do fluxo sangüíneo. A formação de vasos sanguíneos em músculos esqueléticos isquêmicos depende de três processos: vasculogênese, arteriogênese e angiogênese⁶.

A progressão da doença, antes de chegar a um quadro irreversível, apresenta uma tentativa de revascularização do território isquêmico por meio de uma neoformação vascular a partir de vasos adjacentes à área comprometida^{4,7}. Este processo é afetado por diversos fatores e normalmente não consegue ser eficaz. Uma opção nestes casos seria promover uma

estimulação externa para a formação de novos vasos pelo próprio organismo (angiogênese), para compensar o território vascular comprometido^{4,7,8,9}.

Segundo relato de Calux e colaboradores¹⁰, os estudos sobre a angiogênese (ou neovascularização) surgiram a partir de 1935 com a utilização da placenta humana. Este termo designa as etapas pelas quais novos vasos sanguíneos vão se desenvolver a partir de uma estrutura endotelial pré-existente, como é o caso da formação de vasos no adulto, em resposta às demandas teciduais^{4,7,11,12}.

Trata-se de um processo complexo, com várias fases, que inclui a ativação das células endoteliais e pericitos, com aumento do volume do nucléolo e hipertrofia das células endoteliais; degradação da membrana basal do vaso-mãe; migração e proliferação das células endoteliais; formação do lúmen vascular; migração e proliferação dos pericitos a partir dos vasos pré-existentes e sua deposição em torno de novos capilares; alteração da matriz extracelular e formação de nova membrana basal; formação das alças capilares; persistência e diferenciação dos capilares neoformados; formação da rede capilar e organização dos vasos maiores^{2,8,10,12,13,14,15}.

Esta fase inicial é mediada por vários fatores de crescimento, incluindo o Fator de Crescimento do Fibroblasto (FGF), o Fator de Crescimento Endotelial (VEGF) e o Fator de Crescimento da Insulina (IGF-1), todos com afinidade pela heparina, sendo mitogênicos e estimulando as células endoteliais a migrarem e formarem novos vasos¹⁰. Entre outros fatores de crescimento estão, as citocininas, as proteases e os inibidores da protease provenientes de monócitos ativados, de células endoteliais, de células musculares lisas e de plaquetas^{2,8,12,13,16}.

Após esta fase, ocorre um estágio subsequente de estabilização dos vasos neoformados, com a participação de outros fatores angiogênicos, como a angiopoitina-1, a angiopoitina-2 e o fator de crescimento derivado de plaqueta^{2,8,15}, além da proteína-1 quimiotática do monócito(MCP1)¹⁷.

A neoformação vascular, além de ocorrer em face das neoplasias malignas, também o faz nos processos fisiológicos como na maturação dos folículos ovarianos, na formação do corpo lúteo e no reparo do endométrio funcional, surgindo ainda nos processos patológicos benignos como osteoartrite, em várias doenças oftálmicas, na reação imunológica e na fisiopatologia do processo de reparação de feridas^{10,18}.

As pesquisas relacionadas a angiogênese iniciaram-se a partir de 1970, partindo-se da hipótese de que o crescimento de um tumor cancerígeno necessitaria de uma

neovascularização constante¹². Ao longo do tempo, foi possível o cultivo de células endoteliais *in vitro* e o desenvolvimento de modelos de angiogênese. As primeiras purificações dos fatores angiogênicos foram conseguidas após 1980, sendo que em 1985 foram identificados os primeiros inibidores da angiogênese¹⁹. A partir de 1990 caminhou-se em duas direções: pesquisar fatores que, inibindo a angiogênese, impediriam o crescimento tumoral, e, oposto a isto, pesquisar substâncias que estimulando a angiogênese poderiam ser úteis no tratamento de tecidos isquêmicos, principalmente do miocárdio e dos músculos esqueléticos dos membros inferiores^{20,21}.

Atualmente os estudos continuam nestes dois sentidos, e, especificamente na cirurgia vascular periférica, a angiogênese terapêutica está em sua fase inicial. Após um entusiasmo inicial, a perda de positividade nos primeiros ensaios clínicos, reduziu o otimismo, pois a simples suplementação de fatores de crescimento para o membro inferior, usualmente não seria suficiente para uma terapia eficaz^{22,23}.

A Medicina, apesar dos avanços científicos e tecnológicos, ainda não consegue, em muitos casos, evitar a perda de membros, principalmente os inferiores, em pacientes no estágio final das doenças arteriais isquêmicas. Estes têm alto índice de morbidade, mortalidade ou implicações funcionais, o que torna problemática a escolha de uma solução para os sintomas incapacitantes, sobretudo a dor em repouso provocada pela isquemia crítica. A angiogênese terapêutica surge como uma alternativa promissora para a abordagem destes indivíduos.

O termo angiogênese terapêutica vem sendo usado desde 1993²⁴, sendo que seu objetivo primário é favorecer a indução de formação de novos vasos para suprimirem tecidos isquêmicos^{9,25}. Várias substâncias têm sido usadas na indução e ou manutenção da angiogênese, tais como: o Fator de Crescimento Endotelial (VEGF), o Fator de Crescimento do Fibroblasto (FGF), o Fator de Crescimento da Insulina (IGF-1), Fator de Necrose Tumoral (TNF), Fator de Crescimento da Célula Endotelial derivado de Plaquetas (PD-ECGF), fator de crescimento placentário, fator de crescimento do hepatócito, fator de crescimento da epiderme, diversas moléculas de baixo peso molecular, como angiopoitina, butinil-glicerol, prostaglandinas E1 e E2, nicotinamida, adenosina, leptina, proliferina, tirosina, interleucina 8, produtos do ácido hialurônico, ácido hidroxucosatrinoico e ácido ohádico, e complexos de cobre^{9,14,16,26,27}. A limitação do uso de tais drogas está relacionada com a resposta ao estímulo

angiogênico artificial, pois há uma tendência natural para regressão do processo, a menos que ocorra uma remodelação para maturação e se tornem estáveis^{8,28}.

Entre as substâncias utilizadas para promover a angiogênese está a Prostaglandina E1 (PGE₁), uma substância endógena com alta atividade biológica, já em uso para a doença arterial oclusiva crônica como vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária^{8,20,21,29}. Promove vasodilatação direta e age na ativação da fibrinólise, na modulação da proliferação celular, na fibrinogênese, na antiagregação plaquetária, na atividade hemorreológica sobre o eritrócito, na inibição e a na ativação de neutrófilos e na melhora da utilização do oxigênio e da glicose pelos tecidos²⁹⁻³³.

Além destes efeitos, há evidências de que a PGE₁ estimula a angiogênese em situações de isquemia miocárdica^{29,34,35}. Em situações de isquemia periférica, seja aguda ou crônica, ainda não há relatos de estudos experimentais ou clínicos, utilizando a PGE₁ com esta finalidade.

O Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação da UNIFESP-EPM desenvolve uma linha de pesquisa sobre as repercussões teciduais e orgânicas da isquemia e reperfusão, em particular em músculo esquelético de ratos³⁶⁻³⁹. Embora a linha esteja voltada até o momento para repercussões de ordem aguda, considerou-se que a angiogênese é um fator importante a ser pesquisado na busca de meios terapêuticos para tecidos isquêmicos. Assim, a proposta desta pesquisa foi verificar o papel da PGE₁ como estimuladora ou moduladora dos processos de angiogênese na musculatura esquelética de membros caudais de ratos submetidos a um modelo de isquemia.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Estudar a ação da PGE_1 sobre a gênese de capilares sanguíneos em membros isquêmicos de ratos.

OBJETIVO ESPECÍFICO:

Estudar aspectos morfológicos e ultra-estruturais na gênese de capilares sanguíneos em músculo esquelético do membro caudal de ratos submetidos à isquemia sob a ação da PGE_1 administrada por via intramuscular ou endovenosa.

3. MÉTODOS

AMOSTRA

Esta pesquisa foi submetida a apreciação e aprovação pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da UEM sob o Protocolo número 054/2003 e ratificada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNIFESP – EPM, sob o Protocolo número 0383/04 (Apêndice).

Foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), linhagem Wistar-UEM, machos, adultos, pesando entre 280 e 300 gramas, procedentes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

A experimentação foi desenvolvida no Laboratório de Inflamação do Departamento de Farmácia e Farmacologia da UEM. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial deste Departamento, em gaiolas apropriadas, individuais, com iluminação natural e temperatura de 23° C, com água e ração *ad libitum* até o momento da operação.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos de 20, redistribuídos igualmente em dois subgrupos:

Grupo I - Ratos submetidos à isquemia (I):

- I-7 – Observados até o 7º dia de pós-operatório (PO);
- I-14 – Observados até o 14º dia de PO.

Grupo II - Ratos submetidos à isquemia e injeção intramuscular (IM) de PGE₁:

- IM-7 – Observados até o 7º dia de PO;
- IM-14 – Observados até o 14º dia de PO.

Grupo III - Ratos submetidos à isquemia e injeção endovenosa (EV) de PGE₁:

- EV-7 – Observados até o 7º dia de PO;
- EV-14 – Observados até o 14º dia de PO.

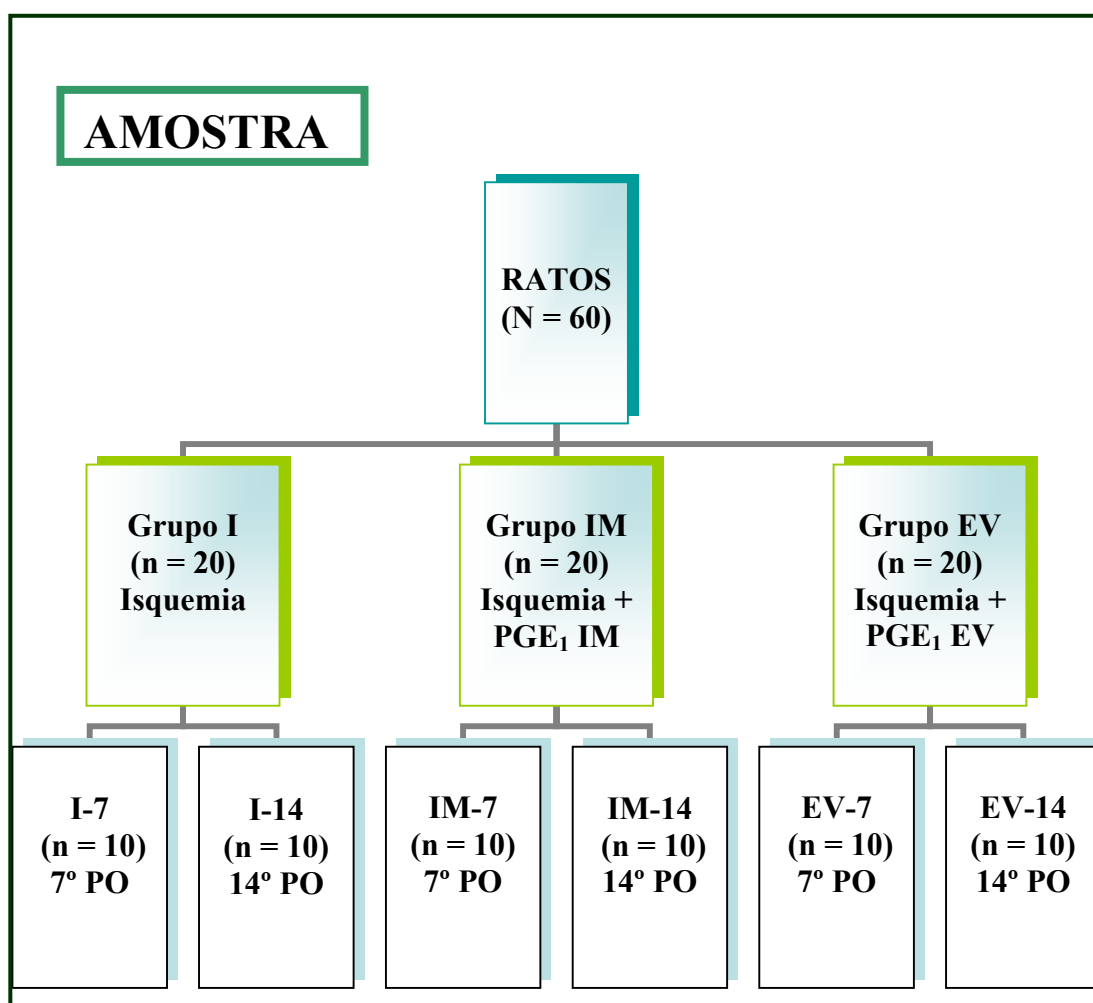


Figura 1 - Fluxograma mostrando a distribuição dos animais nos grupos Isquêmicos (I), com o uso da PGE₁ Intramuscular (IM) e com o uso da PGE₁ Endovenoso (EV) e nos respectivos subgrupos aos sete e quatorze dias de observação.

PROCEDIMENTOS

Procedimento anestésico

Os animais foram anestesiados, via intramuscular, com cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Ronpun[®]) e cloridrato de quetamina (Ketalar[®]) na relação 1:1, empregando-se desta associação 1ml.Kg⁻¹ peso corporal. Aguardou-se até que desaparecessem os reflexos interdigital e ocular. A ventilação pulmonar foi mantida de maneira espontânea. Quando houve sinais de superficialização da anestesia foi aplicado mais 0,1ml da mesma solução anestésica.

Até a recuperação da anestesia os animais foram observados quanto ao reflexo ocular (pela estimulação da pálpebra superior com gaze), frequência respiratória (observação direta dos movimentos tóraco-abdominais) e frequência cardíaca (verificada com estetoscópio pediátrico fixado na região anterior do tórax).

Procedimento de isquemia

Após a tosquia da região medial do membro caudal direito, os animais foram posicionados em decúbito dorsal horizontal sobre a mesa operatória, com imobilização dos membros torácicos e caudais com elásticos. A anti-sepsia foi realizada com tintura de polivinilpirolidona-iodo a 1% e a delimitação do campo operatório com panos esterilizados.

Baseado em modelo da literatura^{31,40-45}, foi feita uma incisão longitudinal com bisturi lâmina 15 interessando pele e tela subcutânea, estendendo-se distalmente do ligamento inguinal até um ponto próximo à patela. Após a identificação do feixe vaso-nervoso (Figura 2A), a artéria femoral foi dissecada em toda sua extensão, desde a região inguinal até a artéria poplítea, usando-se lupa cirúrgica com aumento de 3x. A artéria ilíaca externa foi dissecada e ligada com fio de algodão 4-0. A artéria femoral foi completamente excisada, desde sua origem proximal, na artéria ilíaca externa, até a sua porção distal (Figura 2B) onde ocorre a bifurcação em artérias safena e poplítea. Deste modo provocou-se a isquemia no membro caudal do rato. Os planos anatômicos foram aproximados e a pele suturada com fio de poliamida 5-0.

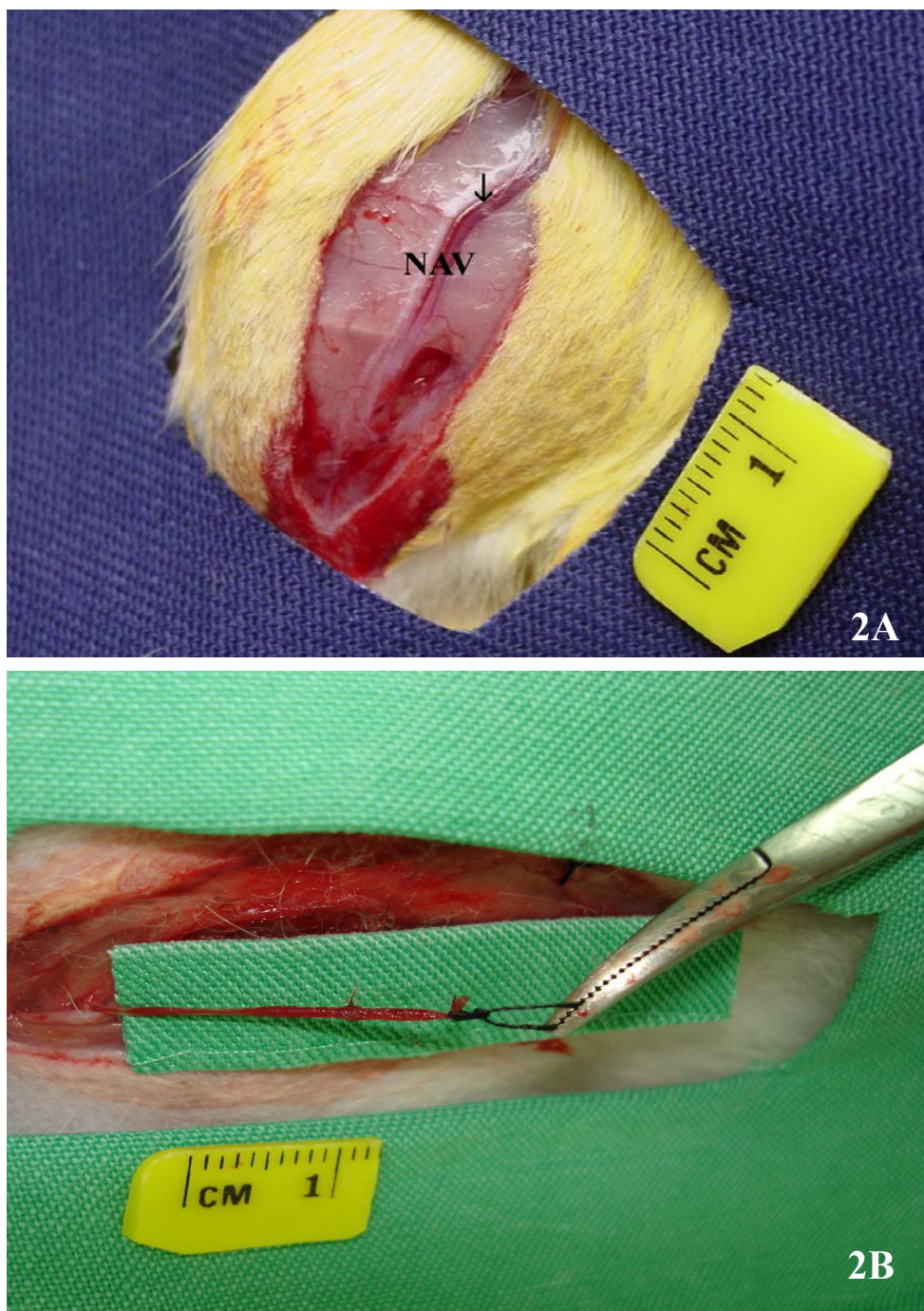


Figura 2 - Fotografias da região medial do membro caudal direito de rato, após a incisão da pele e tela subcutânea, mostrando: (2A) a disposição do feixe vâsculo-nervoso (N = nervo; A = artéria; V = veia) com destaque para a artéria femoral (seta); (2B) o isolamento e a ligadura distal da artéria femoral.

Aplicação da Prostaglandina E₁

Imediatamente após o procedimento de isquemia e antes da sutura da pele, a PGE₁, na dose de 5µg.Kg⁻¹, foi cuidadosamente injetada nos animais utilizando-se seringas de 1ml e agulhas 30G^{1/2}: no Grupo II, via intramuscular (Figura 3A), em pontos equidistantes, diretamente nos músculos grácil e vasto medial do membro caudal; no Grupo III, via endovenosa, pela veia dorsal do pênis (Figura 3B).

Cada ampola continha 20µg de Alprostadi[®] (PGE₁), sendo apresentada sob a forma liofilizada. A diluição foi feita em 5ml de água destilada, obtendo-se assim uma concentração de 4µg.ml⁻¹.

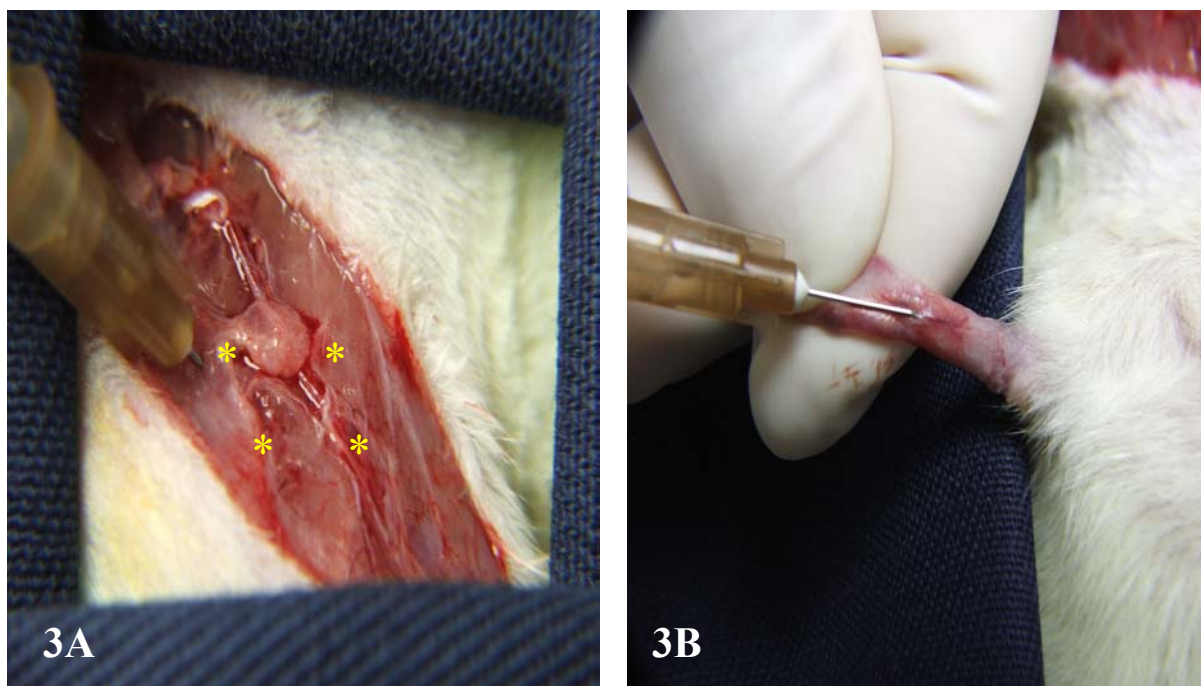


Figura 3 - Fotografias mostrando: (3A) os quatro pontos de injeção IM (*) na região medial do membro caudal do animal; (3B) administração EV em veia dorsal do pênis do animal.

Dados de Observação

Durante o período de observação de sete e quatorze dias, os animais foram examinados diariamente quanto aos seguintes aspectos:

- a) na ferida operatória - presença de hematoma, deiscência, infecção ou isquemia da borda;
- b) no membro caudal - presença de necrose da pele, necrose de dedo(s) ou gangrena;
- c) no aspecto funcional do membro - presença de claudicação (“arrasto”) ou paralisia.

Os animais que viessem a óbito seriam necropsiados para determinar a *causa mortis* e não seriam repostos.

Eutanásia e Coleta de Peças Operatórias

Sob anestesia no 7º e 14º dia de observação, após incisão interessando pele e tela subcutânea na região medial do membro caudal, a área onde foi retirada a artéria femoral foi dissecada, isolada e foi retirado um segmento englobando tecidos musculares e o feixe vâsculo-nervoso (Figura 4). Foram imersos em uma solução de paraformaldeído 10% tamponada, para fixação e posterior processamento histológico. Um ponto de poliamida marcou o segmento de fixação proximal (origem) do feixe muscular.

Após a coleta dos tecidos os animais foram submetidos à inalação de uma dose letal de éter etílico, até a parada cardíaco-respiratória.



Figura 4 – Fotografia mostrando a peça retirada para o processamento histológico, composta de um segmento da parte medial do membro caudal que englobou tecidos musculares e o feixe vâsculo-nervoso, sem a presença da artéria femoral.

Processamento das Amostras

O processamento e a análise das amostras foram realizados no Laboratório de Histotécnica Animal do Departamento de Ciências Morfofisiológicas da UEM.

Após a fixação inicial, o material teve seu tamanho reduzido. Depois de um período total de fixação de 24 horas, procedeu-se a desidratação e inclusão em parafina.

Foram feitos cortes semi-seriados de 5µm, que foram fixados em lâmina de vidro e corados com hematoxilina e eosina (H-E) para avaliação morfológica do tecido e para a determinação do número de capilares sanguíneos, ou processados para técnica imuno-histoquímica para o estudo da neovascularização.

Para contagem dos capilares, realizada por dois observadores, foi utilizado um retículo de 10x10 pontos, acoplado à ocular, em microscópio óptico (Olympus® BX41) com a objetiva de 40x. Os vasos foram quantificados em vários cortes histológicos, totalizando 60 campos microscópicos/animal, sendo que cada campo mediu 0,24mm². Os resultados foram expressos como a média das duas contagens do número de capilares em 60 campos/subgrupo.

As lâminas selecionadas para procedimento imuno-histoquímico foram desparafinizadas e os cortes reidratados. A identificação das células endoteliais foi feita por coloração imuno-histoquímica para detectar o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) usando um anticorpo policlonal, anti-VEGF (Santa Cruz Biothecnology), extraído de coelho na concentração de 1:200, e a glicoproteína CD34 utilizando um anticorpo policlonal anti-CD34 (Santa Cruz Biothecnology), extraído de coelho, na concentração de 1:50.

A coloração para imunoperoxidase foi realizada como se segue: para a recuperação antigênica os cortes histológicos foram mantidos em PBS (*phosphate- buffered saline*), pH=7,3, e submetidos à pressão de uma atmosfera em autoclave. Após o resfriamento, os cortes foram incubados em peróxido de hidrogênio 10% por 20 minutos, para o bloqueio da atividade da peroxidase endógena. Após lavagem com água, as amostras foram incubadas com anticorpo primário (anti-VEGF ou anti-CD34) durante uma noite a 4°C. Em seguida foram lavados em PBS e incubados com anticorpo secundário biotinilado por 30 minutos em temperatura ambiente. Após lavagem em PBS procedeu-se a revelação com 3,3-diaminobenzidina tetrahidrocloreto a 0,05% desidratado (DAB). Os cortes foram finalmente contracorados com hematoxilina de Harris e subseqüentemente montados com resina.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico (Olympus® BX41), e foi determinada a positividade da reação.

Procedimento de Microscopia Eletrônica

Para a realização de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), no Centro de Microscopia Eletrônica (CEME) da UNIFESP-EPM, foram utilizadas amostras de dois animais de cada subgrupo. A coleta do material procedeu-se como descrito para o processamento histológico e os fragmentos foram adequadamente reduzidos para o processamento.

Os fragmentos de músculo esquelético foram fixados em solução contendo 4% de formaldeído (preparado a partir do paraformaldeído) e 4% de glutaraldeído, em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH=7,2 por 48 horas a temperatura ambiente. Após a lavagem em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH=7,2, durante uma hora, foi realizado uma troca do tampão e deixado nesta solução durante a noite. Pela manhã procedeu-se a pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% tamponado em cacodilato de sódio 0,1M, pH=7,2 durante duas horas, com uma troca após uma hora. Depois da lavagem em água por 60 minutos (com duas trocas) realizou-se a imersão em solução aquosa de acetato de uranila 0,5%, por duas horas, em temperatura ambiente. Após lavagem rápida em água, iniciou-se o processo de desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico, inicialmente a 30%, até o álcool absoluto. Em seguida, efetuou-se a passagem pelo óxido de propileno por 2 horas e iniciou-se a infiltração do material, através da mistura óxido de propileno : Epon, feitas em concentrações crescentes de Epon, a partir de 3:1 até atingir 1:3. A infiltração em Epon puro, foi realizada durante 48 horas, fazendo-se duas trocas diárias da resina.

Após a infiltração em Epon puro, o material foi incluído de acordo com os métodos convencionais; a polimerização ocorreu em estufa a 56C° por 72 horas. Após a polimerização, os blocos foram trimados. Cortes semifinos (refletindo rosa e azul) foram realizados em um ultramicrotomo automático marca Reichert® (Ultracut S/FC S), utilizando-se com facas de vidro confeccionadas com um “Knifemaker” (modelo Reichert Jung®).

Os cortes semifinos foram distendidos em lâminas de vidro e corados à quente, com solução aquosa contendo 1% de azul de toluidina e 1% de bórax. Filtrou-se a mistura antes da coloração, após o que as lâminas foram lavadas em água e secas. Os cortes semifinos foram observados e fotografados em um fotomicroscópio marca Nikon®, modelo Optiphot-II.

A partir dos cortes semifinos realizou-se uma cuidadosa seleção da área de interesse, sendo os blocos retrimados de maneira a possibilitar a obtenção dos cortes ultrafinos. Estes foram obtidos a partir do Ultra microtomo ”Reichert-Ultracut-S”® com

navalha de vidro. Os cortes ultrafinos de coloração prateada levemente dourada (65-85nm), foram coletados em telas de cobre com 300 e 400 “mesh”. Os cortes foram contrastados por oito minutos com acetato de uranila aquosa e com citrato de chumbo por 4 minutos. Cortes ultrafinos foram observados e fotografados no Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL 1200 EXII (80 KV).

Estudo Estatístico

O estudo estatístico foi realizado pela *PGS Medical Statistics* utilizando o *software* SPSS10, e de acordo com a natureza das variáveis foram aplicados os seguintes testes:

As variáveis foram representadas por média, erro padrão da média (epm), mediana, valores mínimo e máximo.

Foram utilizados testes não paramétricos devido à natureza dos dados.

Na comparação entre os grupos de interesse em relação à contagem de capilares em H-E foram utilizados:

- Prova de Mann-Whitney para comparar os subgrupos de tempo de eutanásia dentro de cada grupo de estudo;
- Prova de Kruskal-Wallis para comparar os grupos de estudo dentro de cada tempo de eutanásia.

Adotou-se o nível de significância de 0,05 ($\alpha \leq 5\%$) e níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes e representados por asterisco.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação Macroscópica

Na avaliação macroscópica dos membros caudais operados, houve deiscência parcial da ferida em apenas três dos sessenta animais. Neste modelo não houve sinais imediatos de isquemia, como cianose ou hipotermia da extremidade do membro caudal. Não foi observada claudicação (“arrasto”) em nenhum animal, não houve nenhuma necrose da extremidade do membro caudal e não houve nenhum óbito entre os animais estudados.

4.2 Microscopia de Luz

Nos cortes corados com H-E, as células musculares normais apresentaram-se com o núcleo periférico (Figura 5A) e não foram constatadas alterações degenerativas características de necrose, como a ocorrência de edema ou infiltrado inflamatório. Esta coloração permitiu ainda a contagem dos capilares sanguíneos (Figura 5B) e em alguns animais foram observadas alterações morfológicas decorrentes da isquemia, como a ocorrência de núcleos centrais (Figura 5C).

Nos cortes semifinos, corados com a Toluidina, observou-se o extravasamento de hemácias entre as células musculares (Figura 6A), a também a ocorrência de vários capilares entre as células musculares (Figura 6B) nos subgrupos sob a ação da PGE_1 .

Através da contagem nos cortes corados com H-E constatou-se um aumento estatisticamente significativo no número de capilares nos subgrupos IM-14 (média 43,7 e d.p.m. 6,1) e EV-14 (média 43,7 e d.p.m. 5,6), quando comparados respectivamente aos subgrupos IM-7 (média 24,9 e d.p.m. 3,9) e EV-7 (média 21,0 e d.p.m. 3,3) (Tabela 1).

Na reação de imuno-histoquímica utilizaram-se como marcadores primários os anticorpos anti-VEGF e anti-CD34. Houve marcação de capilares e vasos maiores no subgrupo IM-14 e EV-14 (Figuras 7 e 8), porém, esta reação não foi eficiente para a quantificação destes capilares, uma vez que esta marcação não foi uniforme entre os animais do mesmo grupo. Além disto, na lâmina de um mesmo animal havia uma grande quantidade de vasos não marcados, inviabilizando qualquer análise estatística.

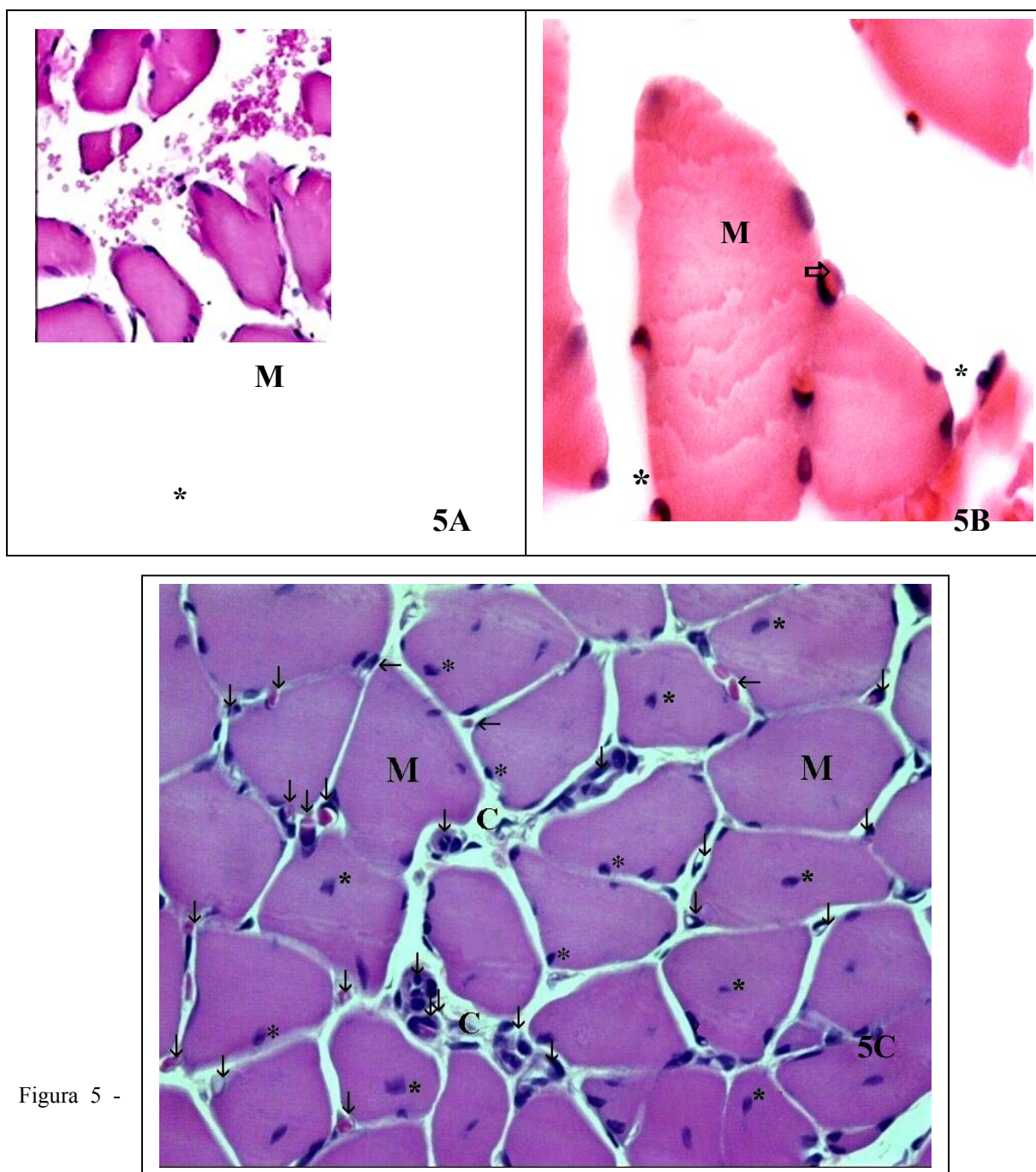


Figura 5 -

Fotomicrografias em microscopia de luz de músculo esquelético de rato mostrando: (5A) a presença de núcleos periféricos (*) nas células musculares em rato do subgrupo Isquêmico observado aos 7 dias (HE, 100x); (5B) os capilares sanguíneos (seta) e núcleo (*) em rato do subgrupo com uso da PGE₁ IM observado aos 14 dias (HE, 1000x); (5C) presença de núcleos centrais (*) e grande quantidade de capilares e vasos maiores (setas) em rato do subgrupo com uso da PGE₁ EV observado aos 14 dias (HE, 960x). M = células musculares; C = fibras colágenas.

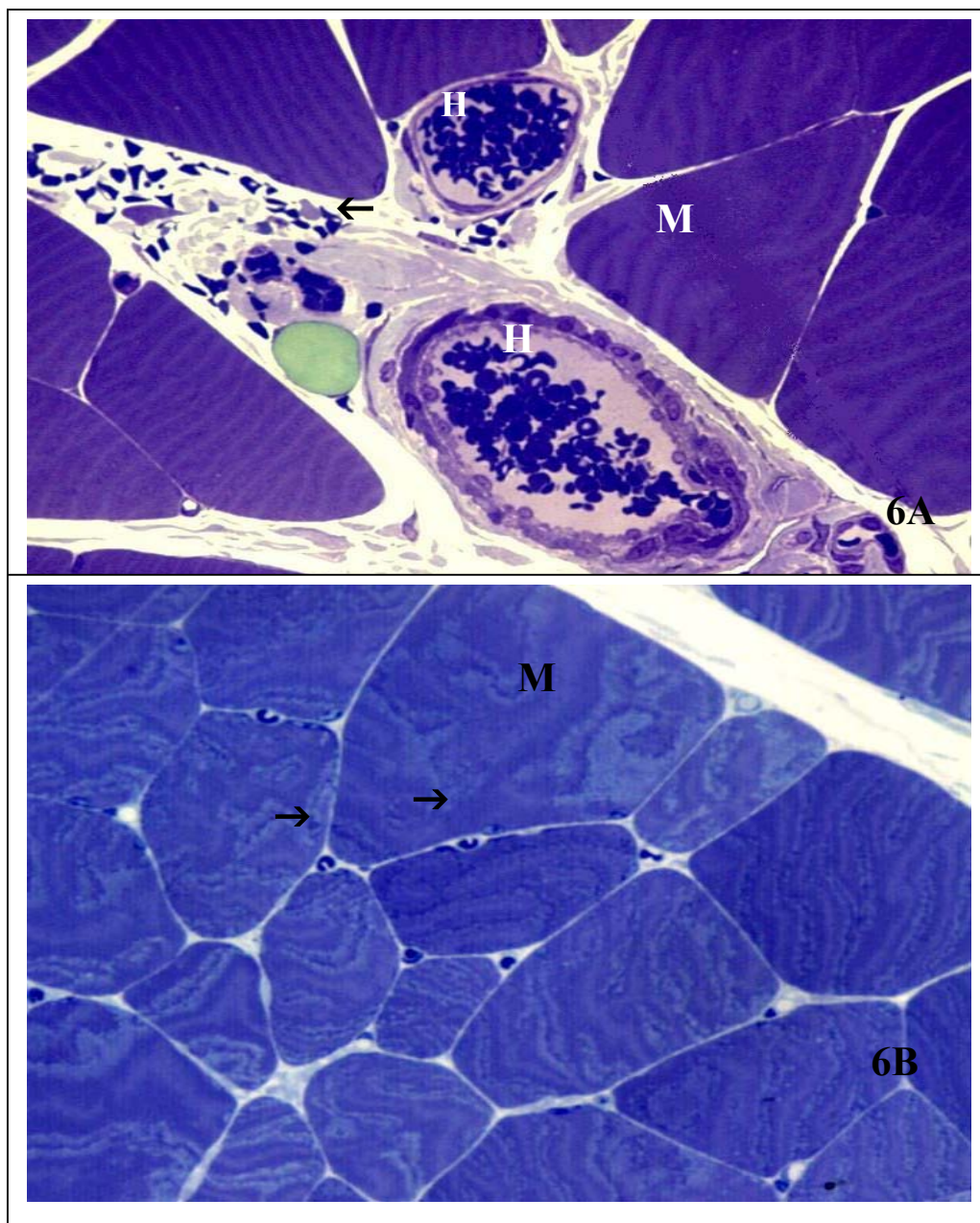


Figura 6

Fotomicrografias em microscopia de luz de músculo esquelético de rato mostrando: (6A), hemácias (H) dentro dos capilares maiores e entre as células musculares (seta), em rato do subgrupo com uso da PGE₁ EV observado aos 14 dias (Toluidina, 960x); (6B) vários capilares (setas) em rato do subgrupo com uso da PGE₁ IM observado aos 14 dias (Toluidina, 960x). M = células musculares.

Tabela 1 - Média, erro-padrão da média, mediana e números mínimo e máximo da contagem de capilares em H-E nos diferentes grupos avaliados.

Grupo	Contagem de capilares em HE					n
	Média	e.p.m.	Mediana	Mínimo	Máximo	
I-7	24,1	1,4	24,5	17	28	8
I-14	26,0	2,2	27,0	18	35	8
IM-7	24,9	3,9	20,5	15	45	8
IM-14	43,7	6,1	45,0	18	65	8
EV-7	21,0	3,3	16,5	13	38	8
EV-14	43,7	5,6	37,5	26	68	8

As comparações entre os subgrupos de tempo de eutanásia dentro de cada grupo de estudo mostraram os seguintes resultados:

- Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos do Grupo I-7 ($p = 0,4418$);
- foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos do Grupo IM ($p = 0,0281$), onde o subgrupo IM-14 apresentou número de vasos significativamente maiores do que o grupo IM-7, Gráfico 1;
- foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos do Grupo EV ($p = 0,0030$), onde o subgrupo EV-14 apresentou número de vasos significativamente maiores do que o grupo EV-7, Gráfico 1.

As comparações entre os grupos de estudo dentro de cada tempo de eutanásia mostraram os seguintes resultados:

- não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos I-7, IM-7 e EV-7 ($p = 0,6469$);
- foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos I-14, IM-14 e EV-14 ($p = 0,0271$), onde os subgrupos IM-14 e EV-14 apresentaram número de vasos significativamente maiores do que o grupo I-14, Gráfico 1.

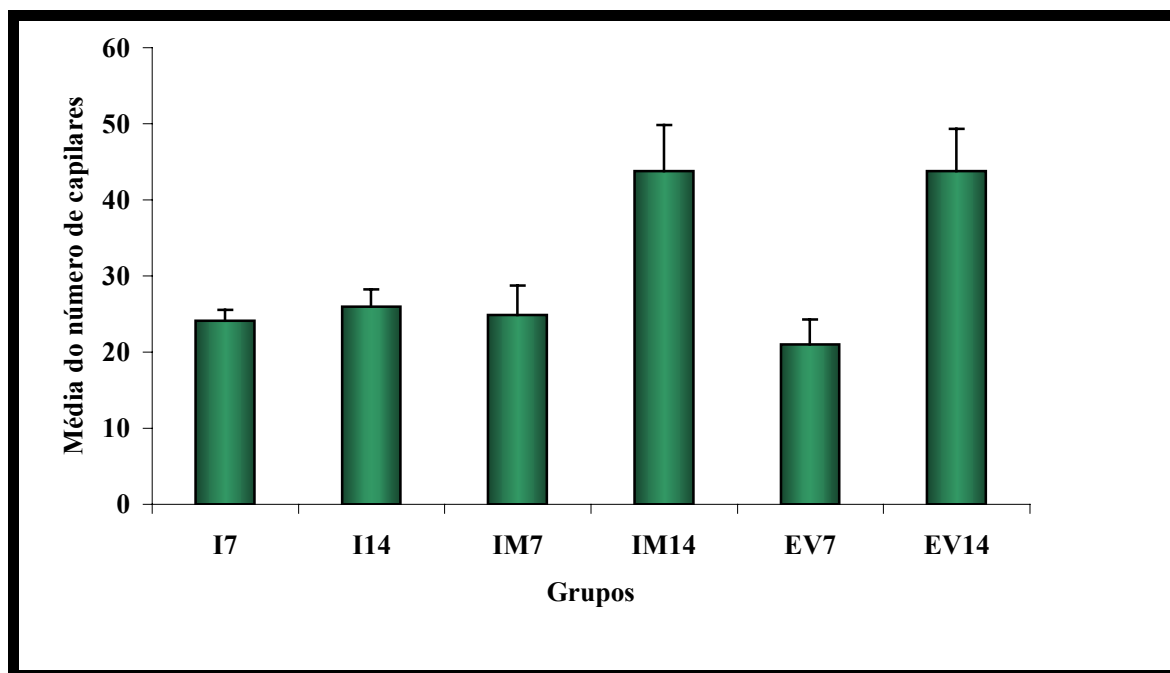


Gráfico 1 – Média do número de capilares sanguíneos quantificados no músculo isquêmico de membro caudal de ratos. Valores representam a média \pm erro padrão da média. $p < 0.05$ quando comparados os seguintes subgrupos: A) IM-7 x IM-14; B) EV-7 x EV-14; C) I-14 x IM-14 e D) I-14 x EV-14.

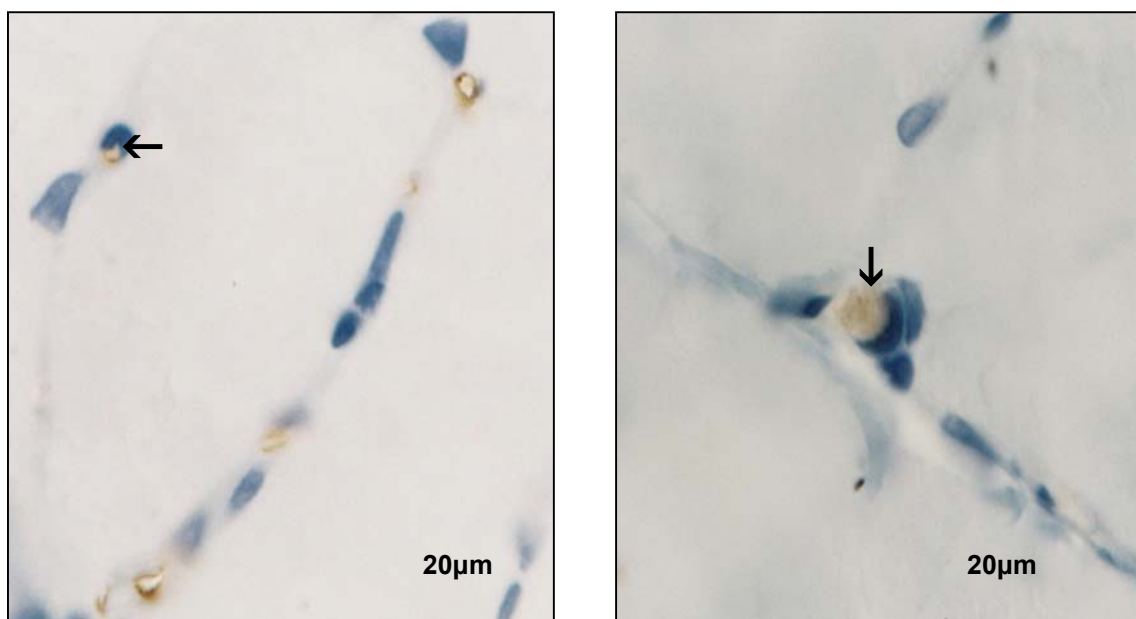


Figura 7- Fotomicrografias em microscopia de luz de músculo esquelético de um animal do subgrupo com uso da PGE₁ IM observado aos 14 dias, mostrando a marcação de capilares através da imunohistoquímica (setas), utilizando o anticorpo CD 34.

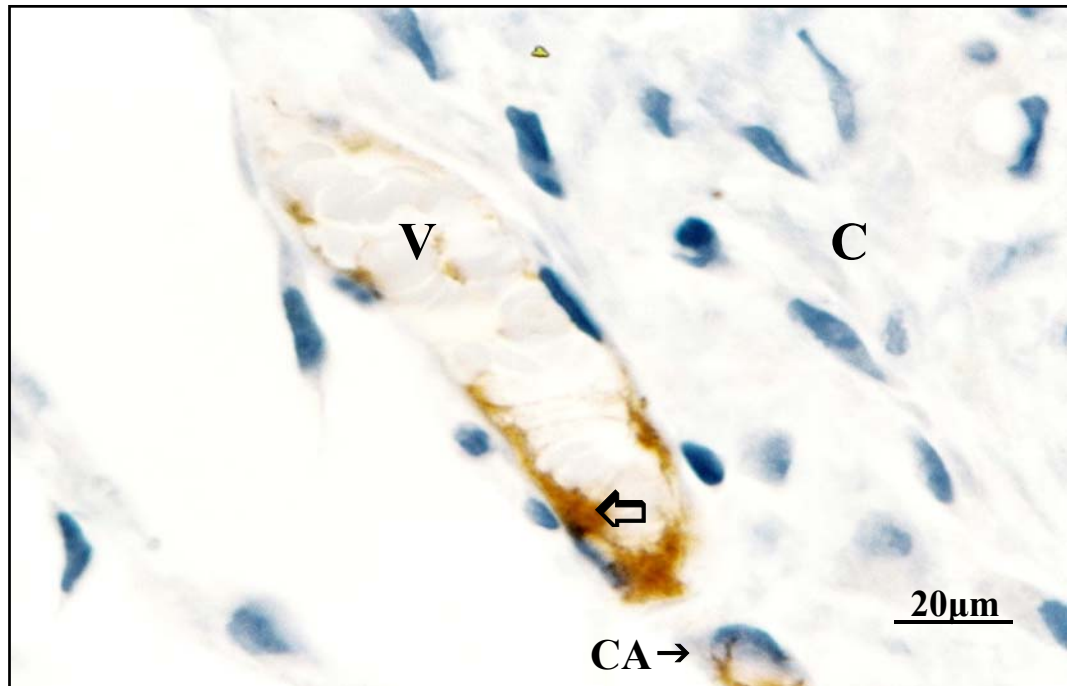


Figura 8 - Fotomicrografia de músculo esquelético de um animal do subgrupo com uso da PGE₁ EV observado aos 14 dias, mostrando a marcação (seta) de um vaso maior (V) e de um capilar (CA) pela técnica de imuno-histoquímica, utilizando o anticorpo VEGF, ambos presentes entre as fibras colágenas (C).

4.3 Microscopia Eletrônica

Os capilares sanguíneos encontrados entre as células musculares eram formados por uma ou mais células endoteliais. No grupo isquêmico, praticamente não houve a ocorrência de alterações que sugerissem a gênese de novos capilares, a maioria se apresentando com aspecto normal (Figura 9).

Nas Figuras 10, 12 e 14, dos subgrupos com uso da PGE₁ IM e EV observados aos 14 dias, encontrou-se evidências de formação de capilares a partir de um agrupamento de células endoteliais, que iniciam a formação da luz do capilar pela abertura de espaço entre elas. Também foi freqüente nos animais destes subgrupos o aparecimento de filopódios na superfície luminal (Figuras 11 e 13).

Na Figura 13, do subgrupo com uso da PGE₁ IM observado aos 14 dias, identificou-se outro achado sugestivo de angiogênese, o brotamento lateral, que ocorre por um desarranjo da membrana basal.

Observou-se em animal do subgrupo IM 14 (Figura 15) uma divisão luminal por processos espessos (ponte) que se estendiam através do lúmen e se fundiam com a membrana do lado oposto, criando capilares com um duplo lúmen, através de um processo de divisão longitudinal.

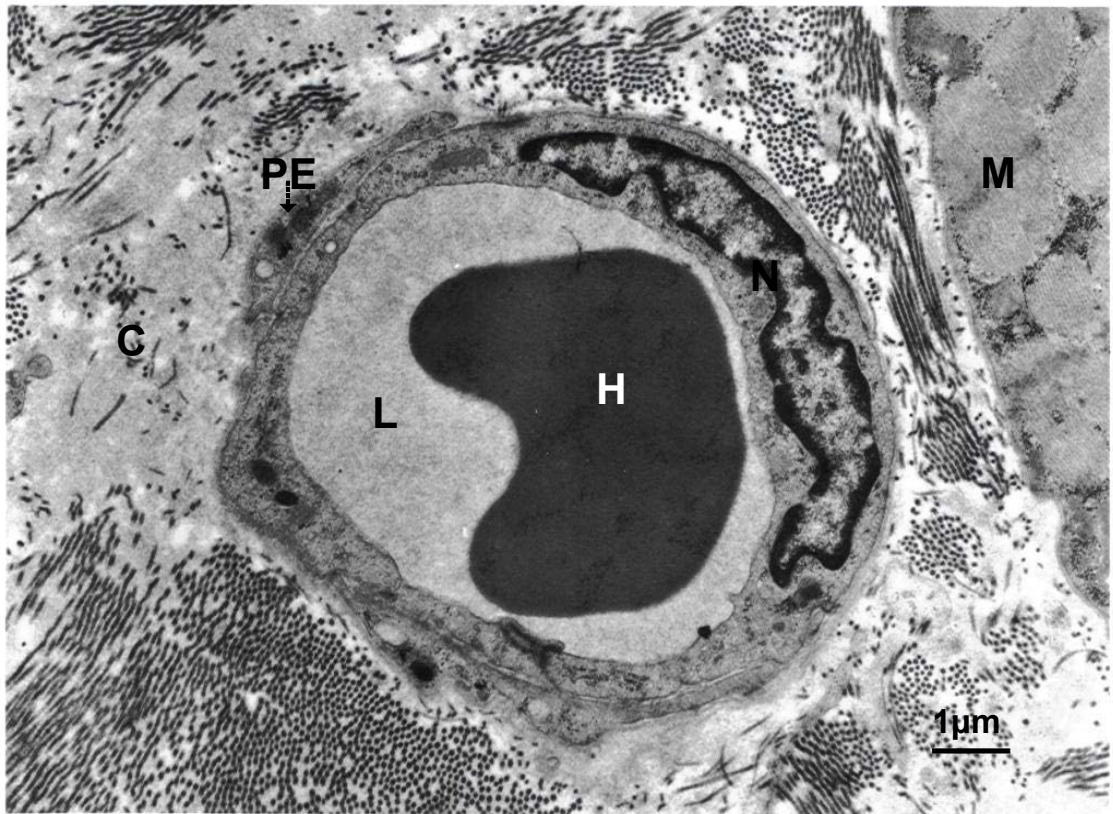


Figura 9 - Eletromicrografia do músculo esquelético de um rato do subgrupo Isquêmico observado aos 7 dias. Observa-se um capilar com hemácia (H) em sua luz (L), com o núcleo denso da célula endotelial (N) e um pericito (PE) em sua borda superior. M = células musculares, C = fibras colágenas.

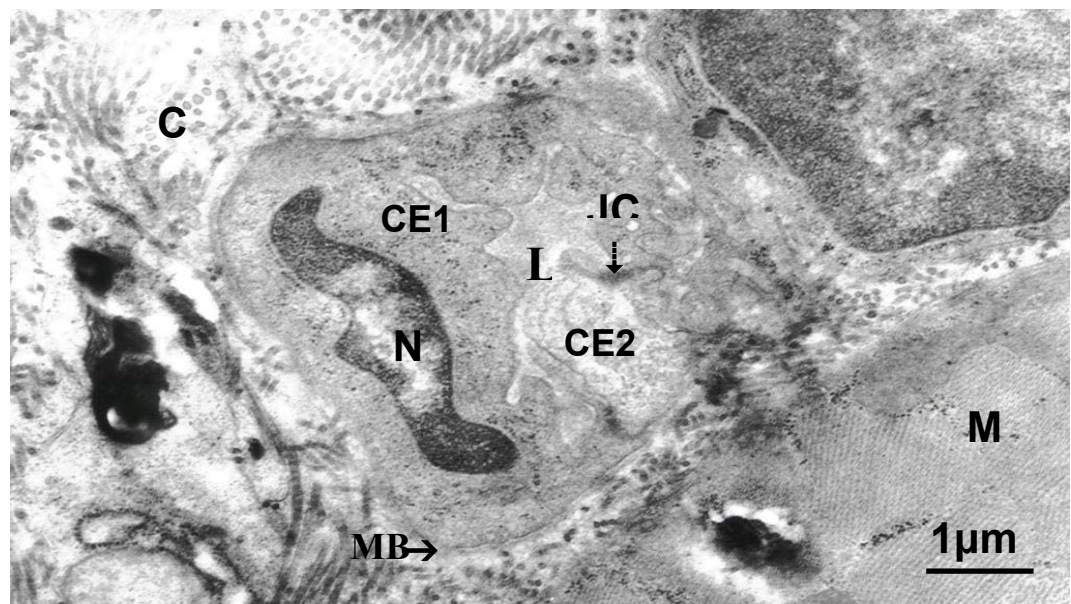


Figura 10 - Eletromicrografia do músculo esquelético de um rato do subgrupo com o uso da PGE₁ EV observado aos 14 dias. Nota-se um capilar sanguíneo em formação a partir de duas células endoteliais (CE1 e CE2), com núcleo (N) denso em apenas uma, que abrem

espaço entre elas formando a luz (L) do capilar. M = células musculares; C = fibras colágenas; MB = membrana basal; JC junção celular.

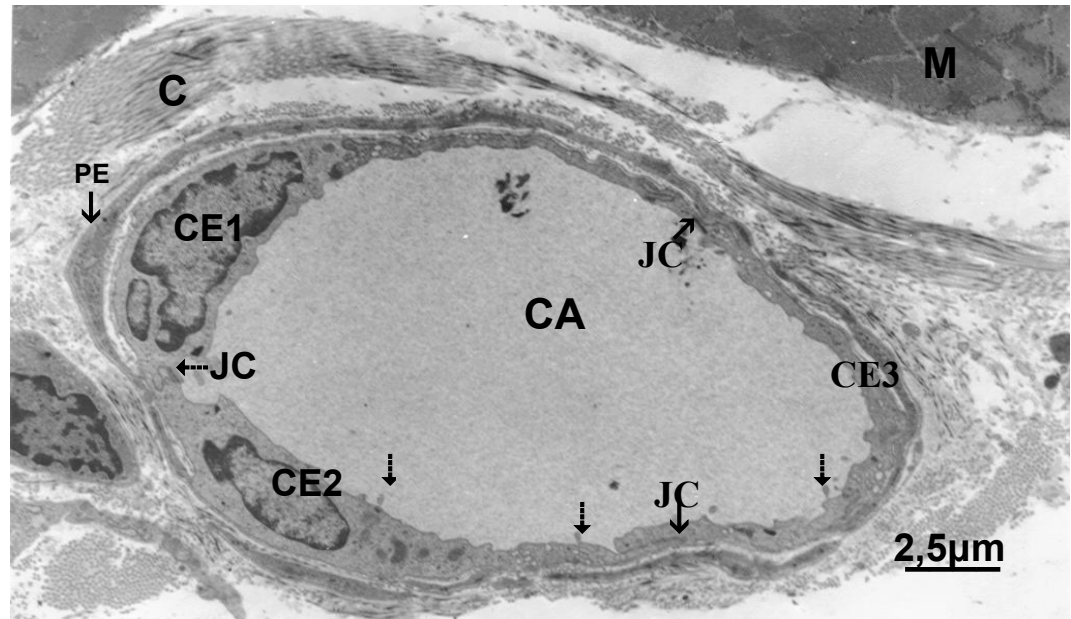


Figura 11 - Eletromicrografia do músculo esquelético de um rato do subgrupo com uso da PGE₁ EV observado aos 14 dias. O capilar sanguíneo (CA) é formado por três células endoteliais (CE) unidas por junções celulares (JC); pequenos filopódios (setas) são observados na superfície luminal do capilar. Um provável pericito (PE) e diversos fragmentos de citoplasma de outros, encontra-se próximo ao capilar. M = células musculares, C = fibras colágenas.

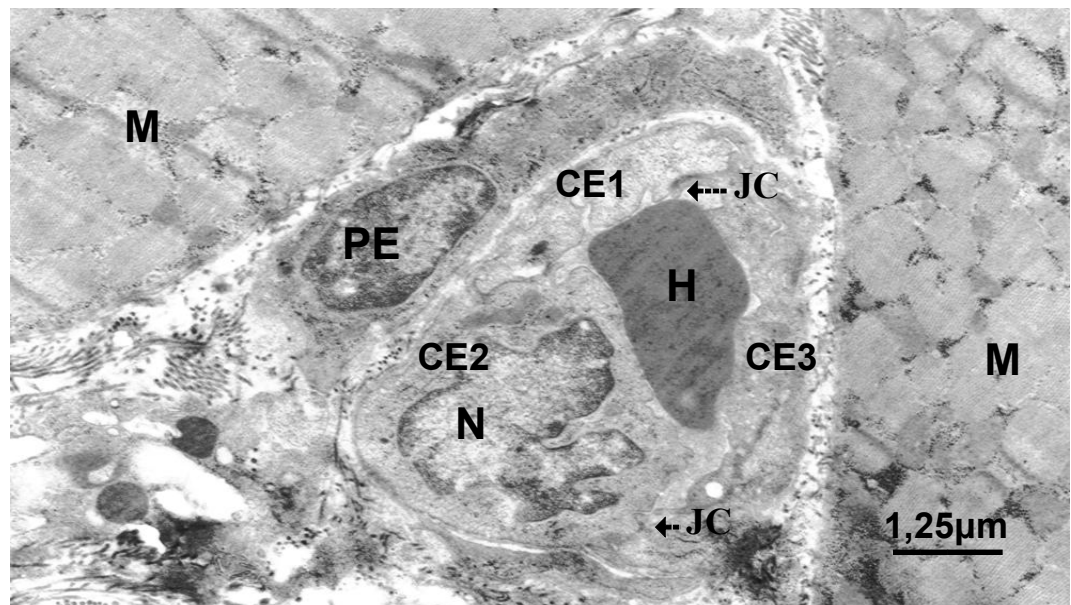


Figura 12 - Eletromicrografia do músculo esquelético de um rato do subgrupo com o uso da PGE₁ IM observado aos 14 dias. Nota-se um capilar sanguíneo formado por três células endoteliais (CE1, CE2, CE3) unidas por junções celulares (JC), com núcleo denso em apenas uma (N). PE = pericito, H = hemácias, M = células musculares.

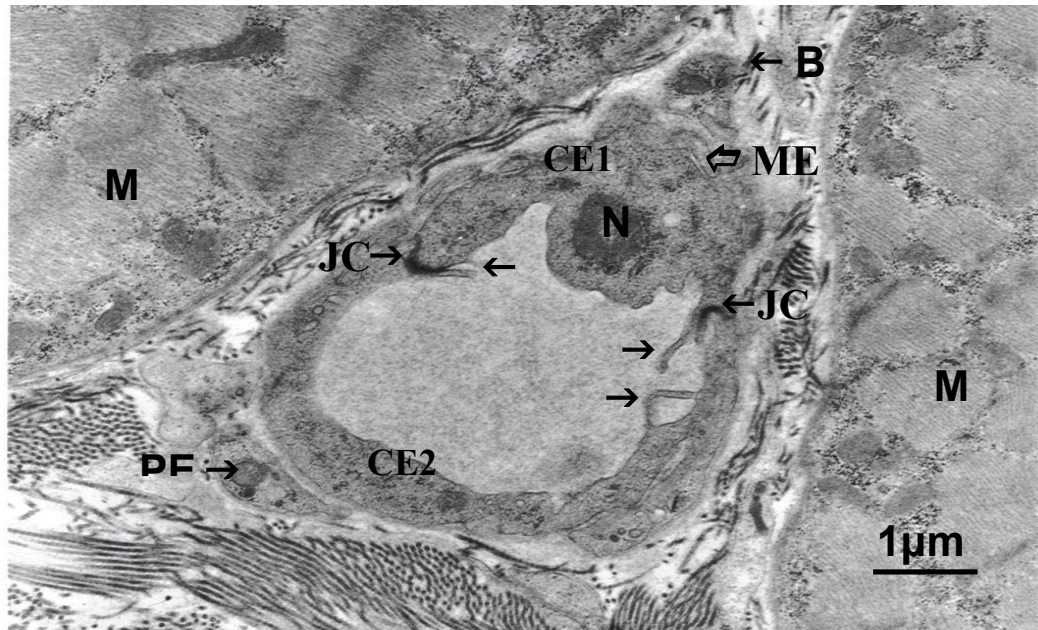


Figura 13 - Eletromicrografia do músculo esquelético de um rato do subgrupo com o uso da PGE₁ IM observado aos 14 dias. Nota-se um capilar sanguíneo formado por duas células endoteliais (CE1 e CE2), com núcleo denso (N) em apenas uma, provavelmente em final de mitose e vários filopódios (setas) em sua superfície luminal. Na borda superior há um provável brotamento (B) do capilar com membrana basal difusa. PE = pericito; M = células musculares; ME = matriz extracelular; JC = junção celular.

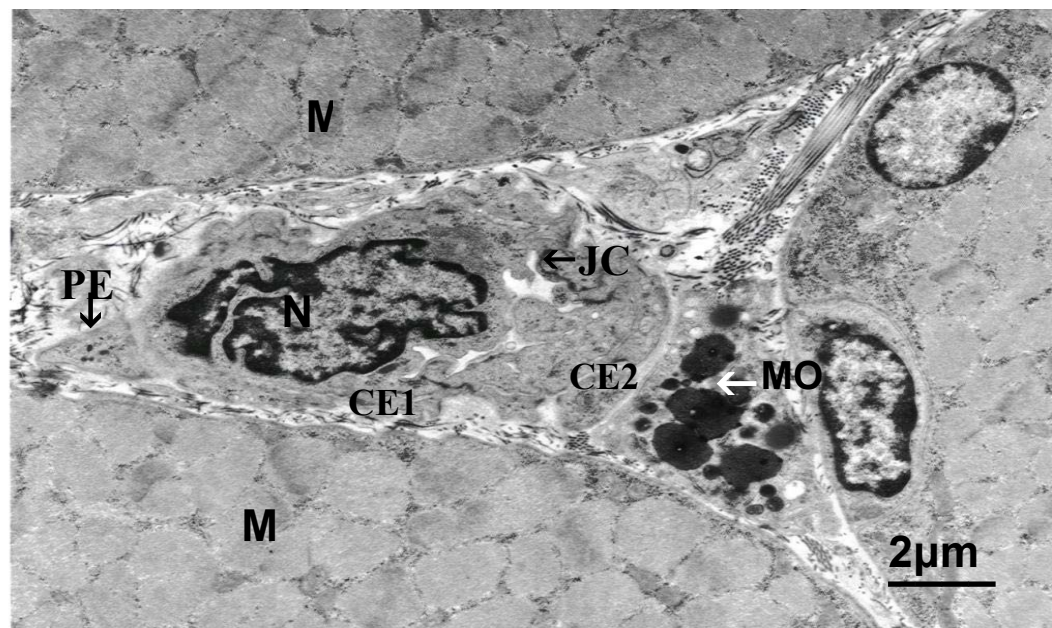


Figura 14 - Eletromicrografia do músculo esquelético de um rato do subgrupo com o uso da PGE₁ IM observado aos 14 dias. Nota-se um capilar sanguíneo em formação com núcleo denso (N) em apenas uma das duas células endoteliais (CE1 e CE2). PE = pericito; M = células musculares; JC = junção celular; MO = vacuolização de células mononucleares.

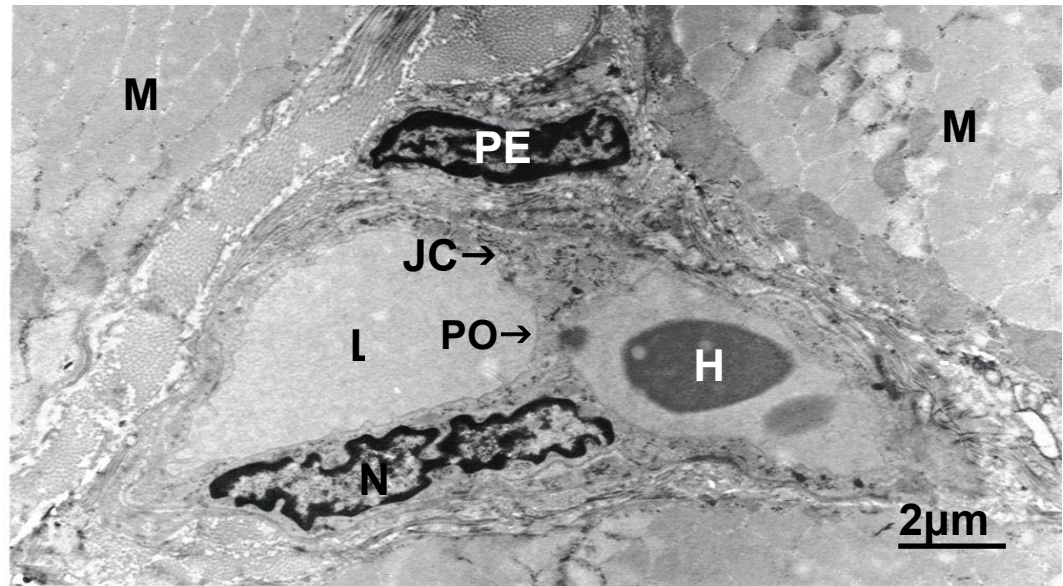


Figura 15 - Eletromicrografia do músculo esquelético de um rato do subgrupo com o uso da PGE₁ IM observado aos 14 dias. Nota-se um capilar sanguíneo formado por célula endotelial com núcleo denso (N) e o lúmen (L) dividido em duas partes por uma ponte (PO) de citoplasma de células endoteliais. PE = pericito; H = hemácia; JC = junção celular; M = células musculares.

5. DISCUSSÃO

A angiogênese terapêutica é uma nova abordagem para o tratamento de doenças vasculares isquêmicas crônicas, que pode ser usada para um número crescente de pacientes que não têm condições de revascularização. Nestes pacientes, que apresentam alta taxa de morbidade e mortalidade em qualquer procedimento, a amputação pode estar indicada para solução dos sintomas incapacitantes, sobretudo pela intensa dor isquêmica em repouso².

A angiogênese pode ser aplicada pela indução dos estimuladores das células endoteliais presentes nos tecidos isquêmicos (modo celular), adicionando ou modificando genes produtores de fatores de crescimento (modo gênico) ou pela administração local ou sistêmica de fatores de crescimento (modo protéico)^{6,46}.

A isquemia isoladamente é um evento que estimula a neoformação vascular em músculo esquelético^{8,27,47,48,49} e cardíaco^{29,34,35}. Este processo é regulado por fatores de crescimento que se localizam nas células endoteliais e na matriz extracelular^{9,50,51}. Dentre os diversos fatores envolvidos destacam-se o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) que inicia o processo de angiogênese e o óxido nítrico (NO), que tem a função de regulação e modulação do VEGF^{31,49}.

O agente ideal para aplicação na angiogênese terapêutica deve apresentar algumas características como: estimular e potencializar a angiogênese, mantendo uma ação duradoura, ter como alvo específico os tecidos isquêmicos; não causar efeitos colaterais; não provocar angiogênese patológica; alcançar alta concentração local; ter um tempo de exposição adequado; ser de fácil reaplicação; poder ser administrado por via oral ou parenteral; ser de baixo custo^{26,52,53}.

A PGE₁ é uma droga vasodilatadora usada no tratamento de doenças arteriais isquêmicas de membros inferiores^{53,54}, e testada experimentalmente para indução da angiogênese em doenças cardíacas isquêmicas^{29,34,35}, além de estimular a angiogênese na córnea de coelhos⁵⁵ e na membrana corioalantóica de embriões de galinha⁵⁶. A ação da PGE₁ sobre a angiogênese se dá indiretamente, pela indução da expressão do VEGF^{29,34}. Partindo deste embasamento teórico, surgiu a idéia de utilizar a droga injetando-a diretamente na área isquêmica ou por via endovenosa, dentro da modalidade de terapia protéica, que tem um enfoque mais convencional e menor risco que a terapia gênica⁶. Também pareceu ser uma estratégia mais viável para eventual utilização na prática médica diária^{57,58}.

A PGE₁ atua como um gatilho para disparar a angiogênese, e sua dosagem apresenta-se elevada em úlceras de pele, exsudatos inflamatórios, neoplasias e em macrófagos ativados¹⁹.

Embora a angiogênese seja fator primordial nos processos isquêmicos crônicos a ação de drogas estimuladoras pode ser testada em modelos agudos de isquemia^{2,31,38,40,42,43,44,49}.

Modelos em animais de experimentação tentam reproduzir as condições de isquemia encontradas em seres humanos e com isso proporcionar um melhor entendimento da fisiopatologia da doença e das suas alternativas de tratamento^{40,41,43-45,47}.

Um dos animais mais freqüentemente citado na literatura em modelos de isquemia, inclusive em membros inferiores, é o rato⁴². Tem a vantagem de fácil obtenção e manipulação, com custos baixos. Nesta pesquisa, em particular, a facilidade de manutenção em ambiente controlado propiciou a elaboração de uma amostra homogênea de ratos machos, com idade e peso similares. Os diferentes modelos de isquemia muscular procuram simular as condições existentes na prática médica e cada um tem princípios racionais para investigar situações específicas^{8,22,46,58}.

Deste modo, entre os diversos modelos optou-se pela excisão da artéria femoral que resulta na propagação de um trombo retrógrado e oclusão da artéria ilíaca externa, conseqüentemente o fluxo sangüíneo para o membro isquêmico torna-se dependente de vasos colaterais a partir da artéria ilíaca interna³¹. O modelo mostrou-se ser confiável e reprodutível, promovendo redução imediata do fluxo arterial demonstrado por arteriografia^{31,41,48}. Os testes do projeto piloto mostraram que o edema e cianose apresentada pela pata do animal após a obstrução arterial foi um parâmetro confiável para comprovar a isquemia do membro inferior.

O procedimento anestésico padronizado pelo Programa de Pós-graduação em experimentos envolvendo ratos preconiza o uso intramuscular da associação de quetamina e xilazina e que foi suficiente para manter os animais em plano anestésico durante todos os procedimentos operatórios. Nos períodos de observação a analgesia proporcionada pela dipirona foi adequada, pois os animais se locomoveram espontaneamente à procura de água e alimento e não apresentaram sinais objetivos de sofrimento.

A PGE₁ é uma droga que está associada à ocorrência de taquicardia e aumento da pressão arterial. Em que pese seu conhecido efeito vasodilatador em arteríolas, esfíncteres e vênulas, em alguns pontos selecionados (por exemplo, rins) a PGE₁ induz a uma resposta vasoconstritora que é mediada pela serotonina^{33,59}. A administração em dose única de PGE₁

($5\mu\text{g.Kg}^{-1}$), atingindo uma média de $2\mu\text{g/animal}$, apesar da taquicardia e aumento na pressão arterial, não foi lesiva ou mortal para nenhum dos animais estudados.

A via de administração é ponto crítico, porque a droga precisa alcançar uma concentração que permita uma longa exposição dos tecidos à sua ação. As vias sistêmica, intramuscular (IM), endovenosa (EV) ou intra-arterial, embora sofram restrições na disponibilidade da droga no local da isquemia, justamente por esta área estar sem circulação sanguínea adequada, são as mais comumente utilizadas, tanto experimentalmente como em ensaios clínicos. Ambas apresentam vantagens e efeitos adversos^{6,44}.

A administração local, ou seja, na própria área isquêmica, seria a melhor opção por poder oferecer a droga em concentração farmacológica diretamente na área carente. A aplicação IM proporcionaria teoricamente uma maior concentração da droga na área isquêmica, podendo ser aplicada em local onde a via sistêmica poderia não alcançar^{6,16,26,60}. Em relação à via intra-arterial, tem a vantagem de poder ser utilizada quando as artérias apresentarem algum comprometimento tão grave que não permitam o posicionamento do cateter próximo à lesão aterosclerótica⁹.

No modelo proposto a administração foi realizada diretamente no músculo isquêmico (IM), em dose única. Para evitar que o volume injetado causasse necrose muscular, tomou-se o cuidado de dividir a aplicação da dose em quatro pontos equidistantes. A observação dos animais não surpreendeu alterações locais ou sistêmicas que pudessem ser atribuídas a escolha desta via de aplicação.

A utilização da via EV não causou alterações sistêmicas que pusessem em risco a vida do animal, o que pôde ser comprovado pela observação dos dados vitais durante o experimento, que apresentaram discreta variação. A aplicação EV tem a vantagem de ser menos invasiva, podendo ser repetida se necessário. Porém, um senão é que grande parte da PGE_1 (70-95%) é inativada em sua primeira passagem pelos pulmões, com conseqüente diminuição de sua biodisponibilidade na área isquêmica³².

Portanto no racional do projeto de pesquisa foi levantada a hipótese de que se houvessem diferenças concernentes à via de administração, os parâmetros estudados poderiam medir esta diferença, o que será analisado adiante na avaliação dos resultados histológicos e de ultra-estrutura.

A observação dos animais mostrou que houve deiscência parcial da ferida operatória em três (5%) dos sessenta ratos operados, mas que somente em um caso necessitou refazer a

sutura da pele. Apesar da isquemia provocada no membro caudal a pele teve boa perfusão tecidual, provavelmente pela circulação colateral extensa existente na área. Também não foi observada a claudicação (“arrasto”) ou necrose do membro caudal em nenhum animal. Trabalhos na literatura biomédica referem que a circulação colateral em ratos é extensa e o músculo esquelético é resistente à isquemia^{2,36,38,39}.

O efeito esperado do uso da PGE₁ na área isquêmica é exatamente sobre a quantidade ou qualidade de vaso neoformados. Deste modo foram estabelecidos parâmetros histológicos, imuno-histoquímicos e ultra-estruturais para tentar estabelecer a relação entre a droga e sua via de administração na angiogênese.

Após a isquemia o processo de angiogênese se inicia entre um a três dias, atingindo o pico da proliferação por volta de sete dias e havendo, a partir de então, uma regressão rápida e progressiva no número de vasos neoformados até vinte e oito dias^{41,48,51,60-62}. Durante este período há relatos de ocorrência de uma assimetria intimal, incluindo várias camadas de células musculares lisas e de lâmina elástica interna^{41,62}.

Uma das características de que a célula muscular está em processo de isquemia, é o deslocamento do núcleo da periferia da fibra para a região central⁶³. Na avaliação histológica das lâminas coradas em HE esta alteração foi notada em todos os tempos de observação, demonstrando que esta regularidade das amostras está relacionada à adequação do modelo proposto em produzir a isquemia muscular.

A contagem de capilares sanguíneos foi possível nas lâminas coradas em HE, uma vez que as estruturas são facilmente identificáveis e passíveis de contagem em campos selecionados aleatoriamente. Nos animais do grupo controle observou-se alguns vasos maiores entre as fibras colágenas, principalmente nos animais no período de quatorze dias. Capilares sanguíneos menores foram observados apenas entre as células musculares. Como o objetivo foi avaliar neoformação vascular, para efeito de contagem consideraram-se apenas os vasos menores, com ou sem hemácias em seu interior.

Nos animais do grupo controle, que não receberam a PGE₁, a contagem de capilares não mostrou diferença significativa entre a observação com sete ou quatorze dias. O fato pode ser devido a não formação de novos vasos neste período ou, caso tenha ocorrido, os mesmos não sofreram a maturação necessária e acabaram regredindo. Uma opção para confirmar esta hipótese talvez exigisse uma ampliação no número de animais, para que com o aumento da

amostragem pudesse eventualmente identificar uma tendência à variação entre os dois períodos.

Aos sete dias de observação nos animais que receberam a droga, independente da via de aplicação não foi constatada nenhuma diferença significativa na presença dos capilares. No entanto, aos quatorze dias de observação, também independente das vias de aplicação da droga, ocorreu um significativo aumento dos capilares na área isquêmica, quando comparados com o período de sete dias e nas mesmas vias de administração. Pode-se inferir que a droga teve um efeito favorável na formação destes capilares em fases mais avançadas do processo. O fato pode ser explicado pela biologia do processo de regeneração ou cicatrização que se encontra neste período, ao redor do décimo quarto dia, na fase proliferativa.

Também aos quatorze dias de observação, os animais dos subgrupos com o uso da PGE_1 , tiveram um aumento no número de capilares na coloração HE, quando comparados aos animais do subgrupo controle. O método empregado não conseguiu diferenciar eventuais vantagens neste aumento no número de capilares que pudessem ser atribuíveis à via de administração, embora existam relatos na literatura biomédica de um resultado mais favorável com o uso local da PGE_1 ^{41,61}.

A angiogênese é modulada por fatores de crescimento que se localizam nas células endoteliais e na matriz extracelular^{50,51}. O Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)⁵¹ está associado ao início de processo de neoformação vascular e é considerado um monitor confiável do processo. Em tecidos cardíacos isquêmicos, a administração exógena da PGE_1 pode estimular a angiogênese medida pela expressão do VEGF^{29,34}. A PGE_1 não estimula diretamente o crescimento endotelial. Seu efeito angiogênico parece ser mediado pela ação parácrina de fatores angiogênicos liberados por outras células⁶⁴, como, por exemplo, estimulando os macrófagos a secretarem fatores de crescimento, como o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF) e a adenosina, entre outros^{19,42}.

A imuno-histoquímica, que é a utilização de técnicas imunológicas ao estudo de células e tecidos, é uma outra maneira de se identificar e quantificar a expressão da angiogênese⁶⁵. Vários métodos estão disponíveis, sendo mais comumente utilizado o indireto, que usa o complexo da avidina-biotina-enzima. O princípio básico do método consiste na adesão do anticorpo (primário) não-marcado a um antígeno presente no tecido ou célula estudados. Essa adesão é visualizada através da união entre esse anticorpo ao complexo avidina-biotina-enzima. A enzima do complexo pode ser peroxidase ou fosfatase alcalina e sua função é

converter uma substância adicionada ao processo e denominada cromógeno em um produto final colorido, que pode ser visualizado ao microscópio⁶⁶.

Logo, este processo é bastante complexo, pois o anticorpo primário deverá se ligar aos epítomos, que se fecharam durante a fase de fixação e processamento do material, e necessitam se abrir durante a fase de recuperação antigênica, feita através de micro-ondas, banho-maria, autoclave ou recuperação enzimática.

No projeto de pesquisa inicial, tendo em vista a informação da literatura biomédica e da experiência do Serviço de Histologia da UEM em imuno-histoquímica pareceu viável e coerente a utilização de marcadores do VEGF como um monitor de neovascularização. Contudo, por problemas prováveis de técnica de imuno-coloração não foi confiável a quantificação dos capilares sanguíneos. Foram feitos dezenas de testes, com variações técnicas como: vários tipos de recuperação antigênica, tempos diversos de incubação, mudanças nas dosagens das alíquotas de anticorpos primários e secundários, variações de lotes com troca do anticorpo primário anti-VEGF por um lote diferente e depois por um outro anticorpo primário, o anti-CD34, uma vez que ele é uma glicoproteína expressa como um marcador para validar a proliferação endotelial em células de tecido normal e em proliferações, benignas ou malignas⁶⁷. Após extensa revisão dos procedimentos e diversos contatos com o fornecedor dos *kits* de imuno-histoquímica, decidiu-se procurar outro laboratório para avaliação no material colhido.

O Laboratório de Patologia de Maringá (LAPAM) realiza esta reação há vários anos e padronizou a utilização da autoclave para a recuperação antigênica. Utilizou-se então o Protocolo deste serviço, e, realizando dois ciclos de 10 minutos à pressão de uma atmosfera, embora não uniforme, finalmente conseguiu-se a positividade da reação.

Como resultado da imuno-histoquímica pôde-se observar que houve a imuno-marcação de poucos vasos, sendo a maioria arteríolas e vênulas localizadas no tecido conjuntivo envolvendo os feixes de fibras musculares. De acordo com os resultados da microscopia óptica os subgrupos IM-14 e EV-14 mostraram um maior número de capilares, quando comparados aos subgrupos IM-7 e EV-7, portanto era de se esperar uma marcação em um maior número de capilares sanguíneos nestes animais. No entanto, não houve esta correspondência e a maioria dos vasos marcados com VEGF era os de maior calibre, com poucos capilares marcados. As reações com CD-34 coraram um número maior de capilares sanguíneos, contudo não houve reprodutibilidade em todos os cortes histológicos,

inviabilizando a contagem. A falta de homogeneidade dos resultados e a sua incoerência com outros achados microscópicos, assim como as variações apresentadas nos grupos usados como testemunha, colocaram as eventuais conclusões sob suspeita, embora a imuno-coloração dos vasos maiores possa sugerir um mecanismo de formação de novos vasos por arteriogênese.

O tempo decorrido com as tentativas de acertar a metodologia de imuno-coloração, assim como os custos envolvidos, encaminharam a pesquisa para outros tipos de marcadores, porém foi descartada, pois a utilização de outros marcadores de crescimento vascular implicava nos mesmos óbices do anti-VEGF e do anti CD-34.

Partiu-se então para uma análise mais pormenorizada da ultra-estrutura dos capilares, que constava do projeto inicial. Após contato com o Centro de Microscopia Eletrônica da UNIFESP-EPM, foram operados dois animais de cada grupo, e as amostras levadas para processamento e análise neste centro.

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi um método de avaliação que permitiu identificar algumas estruturas e fenômenos que são referidos na literatura biomédica como características da angiogênese⁶⁸⁻⁷⁰. São mencionadas alterações morfológicas associadas a angiogênese como: degradação da membrana basal, proliferação de células endoteliais, brotamento lateral, formação de filopódios e aparecimentos de pontes citoplasmáticas no interior dos capilares, bem como, a vacuolização das células endoteliais⁷¹⁻⁷².

A literatura refere que durante o processo de angiogênese, ocorre um desarranjo parcial da membrana basal do capilar seguida de migração de células endoteliais⁷¹. Este parece ser o primeiro sinal da gênese de capilares sanguíneos e habilita a célula endotelial à migrar externamente para formar brotos. Com a progressão deste processo, os novos brotos formados provavelmente fundem-se com os vasos já existentes, formando anastomoses e uma complexa rede⁷¹. Durante este processo aparecem espaços entre as células endoteliais o que permite que as hemácias saiam para o espaço intersticial⁷². Na análise do material foi constatada a presença de hemácias fora do lúmen vascular corroborando a hipótese de um processo de neoformação vascular (Figura 6B). Acredita-se que o brotamento lateral de novos vasos a partir de vasos pré-existentes ocorra por divisão das células endoteliais^{71,73}. O brotamento lateral foi evidente aos quatorze dias de observação nos animais que receberam a droga por via intramuscular (Figura 13), onde se observou um desarranjo da matriz celular e proliferação de células endoteliais.

Nesta investigação, as presenças de células semelhantes aos macrófagos (Figura 14) apresentaram-se de forma variada, mas freqüentemente contendo grandes vacúolos com material eletrodenso em seu interior. Este fato foi sugestivo de neoformação vascular, uma vez que a participação dos macrófagos na indução da angiogênese é tida como importante pela produção de fatores humorais que seriam responsáveis pelo crescimento de novos vasos, pela degradação da matriz extracelular^{61,73,74} e pela estimulação de outras células, tais como células endoteliais e fibroblastos, além de outros fatores angiogênicos⁷⁴. Os macrófagos são ainda responsabilizados pela migração e mitose de células endoteliais⁷⁵.

Quando um sinal angiogênico está presente na face luminal, a resposta do endotélio se faz pela produção e invasão de filopódios que cruzam o lúmen existente, para se fundir com a parede oposta da célula endotelial e desta forma cria um segundo lúmen vascular⁷⁶. A presença de filopódios foi freqüente nos animais aos quatorze dias de observação que receberam a droga tanto IM quanto EV (Figuras 11 e 13). Como o achado não foi verificado no grupo controle, pode-se concluir que a droga seja responsável pelo efeito estimulador da angiogênese.

A “ponte” citoplasmática caracteriza a angiogênese por intusseção que, ao contrário da angiogênese por brotamento, é um conceito relativamente novo em biologia vascular. Estudos ultra-estruturais identificaram quatro diferentes tipos de pontes estreitas de tecidos transcapilares, indicando intusseção⁷⁶. O achado mais comum é o de um tipo de ponte que se forma quando as paredes opostas do capilar se projetam em direção ao lúmen, até que uma toca a outra, no meio do lúmen. Ocorre assim, a formação de uma zona de contato entre as células endoteliais de lados opostos ou, uma ponte transcapilar. Observa-se a presença de pericitos nessa construção endotelial e sugere-se que essas células contráteis provavelmente estão relacionadas com o início do processo de intusseção^{73,77}. Estes pericitos, que ficam próximos aos capilares, além do suporte estrutural, estariam envolvidos na secreção de componentes da matriz extracelular⁷⁶. Foi sugerida também a possibilidade de que os pericitos facilitariam os movimentos migratórios, que ocorrem durante a neoformação dos capilares⁷⁸. A análise do material permitiu identificar uma ponte citoplasmática característica deste processo de intusseção (Figura 15) assim como permitiu identificar a presença de pericitos ao redor dos capilares que exibiam uma atividade de proliferação (Figuras 11, 12, 13 e 14).

Outro mecanismo descrito na literatura^{79,80} é a formação de capilares por vasculogênese a partir de células de natureza desconhecida que se encontram dentro da circulação sangüínea.

Estas células progenitoras circulantes podem ser células endoteliais, células tronco hematopoiéticas ou células tronco do conjuntivo⁷⁹.

Embora não tenha sido caracterizada a presença destas células progenitoras foi possível identificar a vasculogênese como um fenômeno global no material estudado (Figuras 10, 12 e 14). Isto pôde ser constatado pela presença de agrupamentos de células endoteliais intercalados aos capilares na região do tecido conjuntivo e entre as células musculares, promovendo uma abertura de espaço entre estas células e iniciando a formação da luz do capilar. Esses agrupamentos celulares são semelhantes às ilhotas sangüíneas, que aparecem no saco vitelino⁸¹ e são também encontrados no interior do retículo estrelado e próximo ao estrato intermediário⁸². A presença dos agrupamentos celulares nesta região sugere que além do processo de angiogênese, está ocorrendo também um processo de vasculogênese⁷⁶. Esses agrupamentos celulares, semelhantes aos já observados em outros tecidos, seriam responsáveis pela formação de novos vasos, a partir de células endoteliais progenitoras ou angioblastos.

Todas essas diferentes formas de crescimento são conhecidas e identificadas nos vários trabalhos encontrados na literatura biomédica, porém, não se tem conhecimento exato de como elas são controladas⁷⁶.

Estes achados sugerem a presença de angiogênese e de vasculogênese no tecido estudado e caracterizam a influência da PGE₁ no seu aparecimento, independente da via de administração.

Considerações gerais

A angiogênese terapêutica, em doenças arteriais periféricas, tem sido estudada há aproximadamente uma década, e oferece grandes perspectivas para um futuro próximo. Os estudos experimentais mostraram uma melhora no fluxo sangüíneo, porém, os primeiros estudos clínicos em seres humanos, apesar de alguma efetividade, ainda estão longe de uma conclusão definitiva^{6,25,69,83}. São atribuídos como fatores limitantes a dose do fator de crescimento, a duração de sua ação, a via de administração, os vários locais de atuação dos agentes, a seleção dos pacientes, a heterogeneidade dos pacientes, os inibidores endógenos da angiogênese, e um potente efeito placebo^{26,52,53}. O uso contínuo de determinados medicamentos (aspirina, isosorbida, nitratos, espirolactona, furosemide, captopril,

bumetamida, lovostatina, inibidores da ciclooxygenase e claritromicina), assim como a idade avançada, a dislipidemia, o tabagismo e o diabetes, também podem prejudicar o resultado dos estudos clínicos, pois atuariam como inibidores da angiogênese¹⁶.

Ainda não há um consenso sobre o fator angiogênico ideal, ou se seria necessário o uso de uma combinação de fatores de crescimento para promover e manter a angiogênese⁸⁴. O conhecimento das bases celular e molecular da maturação dos vasos sanguíneos pode ser o ponto mais importante do ciclo de vida destes vasos, podendo ser a chave do desenvolvimento das terapias de estímulo ou inibição da angiogênese^{15,28}. O rápido avanço nestes campos e nos sistemas de liberação de medicamentos poderá tornar a angiogênese terapêutica a opção de tratamento padrão nas doenças isquêmicas^{16,85}.

Deste modo, a pesquisa em animal de experimentação tem um espaço importante na contribuição ao conhecimento nesta área. Não só para estabelecer o modelo de isquemia, como no estudo sistematizado da própria angiogênese e drogas moduladoras do processo.

Os resultados mostraram que, dependendo do processamento utilizado, a caracterização e diferenciação da angiogênese e vasculogênese, particularmente em tecido muscular submetido à isquemia, está sujeita a algumas variações de manifestação e conseqüentemente de avaliação.

A avaliação histológica convencional e clássica pela coloração com hematoxilina e eosina pesquisa permitiu mostrar que, nos animais em que se utilizou a PGE₁, houve uma maior presença de vasos no tecido muscular esquelético isquêmico, associados há tempos mais longos de observação, mais precisamente aos quatorze dias, ainda que a técnica não tenha permitido identificar se estes vasos se formaram por angiogênese ou vasculogênese. No entanto, não permitiu diferenciar vantagens sobre a via de administração intramuscular ou endovenosa.

Observou-se ainda que a coloração do material pela técnica de imuno-histoquímica proporcionou a marcação de capilares e vasos de maior calibre, porém, nos tempos estudados não possibilitou que se determinasse se este aumento de vasos, encontrados na coloração com HE aos 14 dias, ocorreu por angiogênese ou por vasculogênese, provavelmente porque neste tempo de observação os capilares sanguíneos não estivessem expressando os marcadores utilizados.

A microscopia eletrônica de transmissão por sua vez conseguiu identificar estruturas e fenômenos morfológicos que foram referendados por outros achados da literatura e que mostrou coerência com o esperado nas situações propostas pelo projeto experimental. As pontes citoplasmáticas, os indícios de brotamento, os pericitos e os filopódios identificados de modo diferenciado entre os grupos estudados permitiram demonstrar que os fenômenos da angiogênese e da vasculogênese estão presentes em tecido muscular esquelético de ratos e que a PGE₁ é uma droga que possuiu efeitos favoráveis sobre ela, independente da via de administração intramuscular ou endovenosa.

6. CONCLUSÕES

1. A Prostaglandina E1 administrada por via intramuscular ou endovenosa promoveu, em músculos esqueléticos de ratos submetidos à isquemia, o aumento no número de capilares, identificáveis histologicamente na coloração pela hematoxilina e eosina, após 14 dias de observação.
2. A Prostaglandina E1 administrada por via intramuscular ou endovenosa promoveu, em músculos esqueléticos de ratos submetidos à isquemia, o aparecimento de estruturas morfológicas, identificáveis por microscopia eletrônica de transmissão, compatíveis com o fenômeno de angiogênese e vasculogênese.
3. As marcações pela imuno-histoquímica com os anticorpos primários, anti-VEGF (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular) ou anti-CD-34, não foram fidedignas para caracterizarem o fenômeno de neoformação vascular em músculo esquelético isquêmico de ratos.

7. REFERÊNCIAS

1. Gama AD. Etiopatogenia e evolução da doença aterosclerótica. In: Brito Cirurgia Vascular. Ed. Revinter. Rio de Janeiro. 1 ed. 2001. pg 129-38.
2. Becker C. Angiogênese induzida por VEGF em ratos submetidos ao transplante celular: Estudo em modelo de isquemia/reperfusão no coração [Tese - Doutorado], São Paulo(SP): Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo; 1994.
3. Hiatt WR. Drug therapy: medical treatment of peripheral arterial disease and claudication. *N Engl J Med*. 2001;344(21):1608-21.
4. Donnely R, Yeung JMC. Therapeutic angiogenesis: a step forward in intermittent claudication. *Lancet*. 2002;359:2048-50.
5. Shyu KG, Chang H, Wang BW, Kuan P. Intramuscular vascular endothelial growth factor gene therapy in patients with chronic critical leg ischemia. *Am J Med*. 2003;114:85-92.
6. Barandon L, Leroux L, Dufourcq P, Plagnol P, Deville C, Duplaa C, Couffinhal T. Gene therapy for chronic peripheral arterial disease: what role for the vascular surgeon ? *Ann Vasc Surg*. 2004;18(6):758-65.
7. Couffinhal T, Dufourcq P, Daret D, Duplaa C. Les mécanismes de l'angiogenèse. Applications médicales et thérapeutiques. *Rev Med Interne*. 2001;22:1064-82.
8. Clover AJP, McCarthy MJ. Developing strategies for therapeutic angiogenesis: vascular endothelial growth factor alone may not be the answer. *Br J Plast Surg*. 2003;56:31-4.
9. Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest*. 1999;103(9):1231-6.
10. Calux NMCT. Angiogênese na neoplasia escamosa do colo uterino. Estudo imunohistiquímico comparativo entre dois marcadores vasculares [Tese - Mestrado], São Paulo(SP): Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo; 1998.
11. Kenpinas WD. O desenvolvimento do sistema vascular. In: Maffei Doenças Vasculares Periféricas. Ed. MEDSI. Rio de Janeiro. 2 ed. 2002. pg 3-17.
12. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971;285:1182-6.
13. Yancopoulos GD, Davis S, Galé NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000;407:242-8.
14. Speck NMG. Influência do estadiamento clínico do adenocarcinoma endometrial na angiogênese [Tese - Doutorado], São Paulo(SP): Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo; 1999.
15. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000;407:242-8.
16. Abo-Auda W, Benza RL. Therapeutic angiogenesis: review of current concepts and future directions. *J Heart Lung Transpl*. 2003;22:370-82.
17. Lindner V, Maciag T. The putative convergent and divergent natures of angiogenesis and arteriogenesis. *Circ Res*. 2001;89:747-8.

18. Ferreira AC. Angiogênese terapêutica. O presente e o futuro. *Arq Bras Cardiol.* 2002;78(2):145-7.
19. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science.* 1987;235:442-7.
20. Chae JK, Kim I, Lim ST, Chung MJ, Kim WH, Kim HG, Ko JK, Koh GY. Coadministration of Angiopoietin-1 and vascular endothelial growth factor enhances collateral vascularization. *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2573-8.
21. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 1992;267:1031-4.
22. Wahlberg E. Angiogenesis and arteriogenesis in limb ischemia. *J Vasc Surg.* 2003;38:198-203.
23. Gounis MJ, Spiga MG, Grahan RM, Wilson A, Haliko S, Lieber BB, Wakhloo AK, Webster KA. Angiogenesis is confined to the transient period of VEGF expression that follows adenoviral gene delivery to ischemic muscle. *Gene Ther.* 2005;12(9):762-71.
24. Hockel M, Schelenger K, Doctrow S, Kissel T, Vaupel P. Therapeutic angiogenesis. *Arch Surg.* 1993;128:423-9.
25. Di Stefano R, Limbruno U, Barone D, Balbarini A. Angiogenesi terapeutica nell'ischemia critica degli arti inferiori. Revisione della letteratura e prospettive della ricerca sulle cellule staminali. *Ital Heart J Suppl.* 2004;5(1):1-13.
26. Henry T. Therapeutic angiogenesis. *Br Med J.* 1999;318:1536-9.
27. Emanuelli C, Madeddu P. Angiogenesis gene therapy to rescue ischaemic tissues: achievements and future directions. *Br J Pharmacol.* 2001;133:951-8.
28. Darland DC, D'Amore PA. Blood vessel maturation: vascular development comes of age. *J Clin Invest.* 1999;103(2):157-8.
29. Mehrabi MR, Ekmekcioglu C, Stanek B, Thalhammer T, Tamaddon F, Pacher R, Steiner GE, Wild T, Grimm M, Spieckermann PG, Mall G, Glogar HD. Angiogenesis stimulation in explanted hearts from patients pré-treated with intravenous prostaglandin E (1). *J Heart Lung Transplantation.* 2001;20(4):465-73.
30. Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med.* 1995;333:1757-63.
31. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JM. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest.* 1998;101:2567-78.
32. Awda JA, Soteriou MC, Drougas JG, Stokes KA, Roberts II LJ, Pinson CW. Plasma prostaglandin E1 concentrations and hemodynamics during intravenous infusions of prostaglandin E1 in humans and swine. *Transplantation.* 1996;61:1624-9.
33. Pacher R, Stanek B, Hülsmann M, Sinzinger H. Effect of prostaglandin E1 infusion in severe chronic heart failure. *Prostaglandins.* 1997;53:221-35.
34. Mehrabi MR, Serbecic N, Tamaddon F, Pacher R, Horvath R, Mall G, Glogar HD. Clinical benefit of prostaglandin E1-treatment of patients with ischemic heart disease: stimulation of therapeutic angiogenesis in vital and infarcted myocardium. *Biomed Pharmacot.* 2003;57:173-8.

35. Mehrabi MR, Serbecic N, Tamaddon F, Kaun C, Huber K, Pacher R, Wild T, Mall G, Wojta J, Glogar HD. Clinical and experimental evidence of prostaglandin E1-induced angiogenesis in the myocardium of patients with ischemic heart disease. *Cardiovasc Res.* 2002;56(2):214-24.
36. Vidigal J. Estudo morfológico do músculo sóleo de ratos na isquemia e reperfusão sob oxigenação hiperbárica [Tese - Mestrado], São Paulo(SP): Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo; 2005.
37. Webster RS. O papel do pré-condicionamento isquêmico na lesão de isquemia e reperfusão do músculo grácil de ratos [Tese - Mestrado], São Paulo(SP): Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo; 2005.
38. Brasileiro JL. Estudo morfológico do músculo sóleo de ratos submetidos à isquemia-reperfusão sob ação da pentoxifilina [Tese - Mestrado], São Paulo(SP): Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo; 2006.
39. Teruya R. Estudo de aspectos morfológicos e funcionais do rim de ratos submetidos à isquemia e reperfusão de músculo esquelético, sob a ação da pentoxifilina [Tese - Mestrado], São Paulo(SP): Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo; 2006.
40. Hayashi S, Morishita R, Nakamura S, Yamamoto K, Moriguchi A, Nagano T, Taiji M, Noguchi H, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J, Ogihara T. Potential role of hepatocyte growth factor, a novel angiogenic growth factor, in peripheral disease. *Circulation.* 1999;100(suppl II):II-301-8.
41. Rakue H, Nakajima H, Katoh T, Usui M, Amemiya T, Miyagi M, Hara T, Tamura K, Sasame A, Naito Y, Nagai Y, Ibukiyama C. Low-dose basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor for angiogenesis in canine acute hindlimb insufficiency. *Jpn Circ J.* 1998;62:933-9.
42. Carmeliet P, Moons L, Collen D. Mouse models of angiogenesis, arterial stenosis, atherosclerosis and hemostasis. *Cardiovasc Res.* 1988;39:8-33.
43. Suzuki M, Iso-o N, Takeshita S, Tsukamoto K, Mori I, Sato T, Ohno M, Nagai R, Ishizaka N. Facilitated angiogenesis induced by heme oxygenase-1 gene transfer in a rat model of hindlimb ischemia. *Bioch Biophys Res Comm.* 2003;302(1):138-43.
44. Al-Khaldi A, Al-Sabit H, Galipeau J, Lachapelle K. Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model. *Ann Thorac Surg.* 2003;75:204-9.
45. Taniyama Y, Morishita R, Aoki M, Nakagami H, Yamamoto K, Yamazaki K, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Ogihara T. Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hindlimb ischemia models: preclinical study for treatment of peripheral arterial disease. *Gene Ther.* 2001;8:181-9.
46. Luyt CE, Meddahi-Pellé A, Ho-Tin-Noe B, Collicec-Jouault S, Guezennec J, Louedec L, Prats H, Jacob MP, Osborne-Pellegrin M, Letourneur D, Michel JB. Low-molecular-weight fucoidan promotes therapeutic revascularization in a rat model of critical hindlimb ischemia. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;305:24-35.

47. Thompson WD, Li WW, Maragoudakis M. The clinical manipulation of angiogenesis: pathology, side-effects, surprises, and opportunities with novel human therapies. *J Pathol.* 2000;190:330-7.
48. Herzog S, Sager H, Khmelevski E, Deylig A, Ito WD. Collateral arteries grow from preexisting anastomoses in the rat hindlimb. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283:H2012-20.
49. Namba T, Koike H, Murakami K, Aoki M, Makino H, Hashiya N, Ogihara T, Kaneda Y, Kohno M, Morishita R. Angiogenesis induced by endothelial nitric oxide synthase gene through vascular endothelial growth factor expression in a rat hindlimb ischemia model. *Circulation.* 2003;108:2250-7.
50. Rosengart TK, Bundensbender KT, Duenas M, Mack CA, Zhang QX, Isom OW. Therapeutic angiogenesis: A comparative study of the angiogenic potential of acidic fibroblast growth factor and heparin. *J Vasc Surg.* 1977;26:302-12.
51. Ito WD, Arras M, Scholz D, Winkeler B, Htun P, Schaper W. Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am J Physiol.* 1997;273:H1255-65.
52. Williams RS, Annex BH. Plasticity of myocytes and capillaries. *Circ Res.* 2004;94:7-8.
53. Simons M. Angiogenesis: Where do we stand now? *Circulation.* 2005; 111:1556-66.
54. Karetova D, Bultas J, Vondracek V, Aschermann M. Alprostatil: modes of action in peripheral arterial occlusive disease. *Am J Ther.* 1997;4(11-12):359-63.
55. Ziche M, Morbidelli L, Parenti A. Nitric oxide modulates angiogenesis elicited by prostaglandin E1 in rabbit cornea. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* 1995;23:495-7.
56. Form DM, Auerbach R. PGE2 and angiogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1983;172:214-8.
57. Ng YS, D'Amore PA. Therapeutic angiogenesis for cardiovascular disease. *Curr Control Trials Cardiovasc Med.* 2001;2(6):278-85.
58. Isner JM. Factores de crecimiento para la angiogénesis terapéutica en las enfermedades cardiovasculares. *Rev Esp Cardiol.* 2001;54:1210-24.
59. Smid M, Husek P. Vasoconstrictor reaction to prostaglandins E1 and E2 in isolated rat hindlimb mediated through serotonin release. *Eur J Pharmacol.* 1993;230:69-76.
60. Madrid JF, Diaz-Flores L, Gutiérrez R, Varela H, Valladares F, Rancel N, Rodríguez F. Participation of angiogenesis from rat femoral veins in the neovascularization of adjacent occluded arteries. *Histol Histopathol.* 1998;13:1-11.
61. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Valladares F, Varela H, Perez M. Intense vascular sprouting from rat femoral vein induced by Prostaglandins E1 and E2. *Anat Rec.* 1994;238:68-76.
62. Diaz-Flores L, Madrid JF, Gutiérrez R, Valladares F, Diaz M, Varela H, Díaz-Flores L. Arterial wall neovascularization induced by glycerol. *Histol Histopathol.* 2001;16:1175-81.

63. Scholz D, Ziegelhoeffer T, Helisch A, Wagner S, Friedrich C, Podzuweit T, Schaper W. Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34:775-87.
64. Harada S, Nagy JA, Sullivan KA, Thomas KA, Endo N, Rodan GA, Rodan SB. Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. *J Clin Invest.* 1994;93:2490-6.
65. Vidal S, Horvath E, Kovacs K, Scheithauer BW, Lloyd RV. Morphologic approaches to the assesment of angiogenesis. *Microscopy and Analysis.* 2002;57:9-11.
66. Polak J, Noorden SV. An introduction to immunocytochemistry. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 1997.
67. Ramani P, Bradley NJ, Fletcher CD. QBEND/10, a new monoclonal antibody to endothelium:assessment of its diagnostic utility in paraffin sections. *Histopathology.* 1990;17:237-42.
68. Kofidis T, Nolte D, Simon AR, Metzakis A, Balsam L, Robbins R, Haverich A. Restoration of blood flow and evalution of corresponding angiogenic events by scanning electron microscopy after a single dose of VEGF in a model of peripheral vascular disease. *Angiogenesis.* 2002;5:87-92.
69. Downs KM. Florence Sabin and the mechanism of blood vesel lumenization during vasculogenesis. *Microcirculation.* 2003;10:5-25.
70. Egginton S, Gerritsen M. Lumen formation in vivo versus in vitro observation. *Microcirculation.* 2003;10:45-61.
71. Zhou AL, Egginton S, Hudlická O. Capillary growth in overloaded hypertrophic adult rat skeletal muscle: An ultrastructural study. *Anat Rec.* 1998;252:49-63.
72. Baratella L, Arana-Chavez VE, Katchburian E. Macrophages and apoptosis in the stellate reticulum of the rat enamel organ. *J Anat.* 2000;197:303-6.
73. Hirschberg RM, Sachtleben M, Plendl J. Electron microscopy of cultured angiogenico endothelial cells. *Microsc Res Tech.* 2005;67:248-59.
74. Lingen MW. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. *Arch Pathol Lab Med.* 2001;125:67-71.
75. Sunderkötter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. Macrophages and angiogenesis, *J Leukoc Biol.* 1994;55:410-22.
76. Egginton S, Gerritsen M. Lúmen formation in vivo versus in vitro observation. *Microcirculation.* 2003;10:45-61.
77. Burri HP, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis - the alternative to capillary sprouting. *Mol Asp Med.* 2002;23:S1-27.
78. Thomas EW. Brain macrophages:on the role of pericytes and perivascular cells. *Brain Res Rev.* 1999;31:42-57.
79. Ribatti, D, Vacca A, Nico B, Roncali L, Dammaco F. Posnatal vasculogenesis. *Mechan Develop.* 2001;100:157-63.

80. Drake CJ. Embryonic and adult vasculogenesis. *Birth Defects Res (part C)*. 2003;69:73-82.
81. Risau W. Differentiation of endothelium. *FASEB J*. 1995;9:926-33.
82. Manzke E. Aspectos estruturais da neoformação vascular do órgão do esmalte de molares de ratos [Tese - Mestrado], São Paulo(SP): Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo; 2004.
83. Lederman RJ, Mendelsohn FO, Anderson RD, Saucedo JF, Tenaglia AN, Hermiller JB, Hillegass WB, Rocha-Singh K, Moon TE, Whitehouse MJ, Annex BH. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study). *Lancet*. 2002;359:2053-8.
84. Palmer-Kazen U, Wariaro D, Luo F, Wahlberg E. Vascular endothelial cell growth factor and fibroblast growth factor 2 expression in patients with critical limb ischemia. *J Vasc Surg*. 2004;39:621-8.
85. Tang GL, Chang DS, Sarkar R, Wang R, Mesina LM. The effect of gradual or acute arterial occlusion on skeletal muscle blood flow, arteriogenesis, and inflammation in rat hindlimb ischemia. *J Vasc Surg*. 2005;41(2):312-20.

8. NORMAS ADOTADAS

Associação Brasileira de Normas Técnicas. Apresentação de originais: NB-1139. Rio de Janeiro, 2001.

Conselho Nacional de Saúde – Resolução nº. 01/88: Normas de pesquisar em saúde. Bioética 1955, 3:137-54.

DeCS - Descritores em Ciências da Saúde. 3^a. ed. São Paulo. Bireme; 1992.

Fagundes DJ. Normas para elaboração de relatório de pesquisa [edição eletrônica – disquete]. São Paulo: UNIFESP-EPM-TOCE, 2001. Disponível em www.unifesp.br/dcir/toce/pg.

Fagundes DJ. Normas para citações e referências [edição eletrônica – disquete]. São Paulo: UNIFESP-EPM-TOCE, 2001. Disponível em www.unifesp.br/dcir/toce/pg.

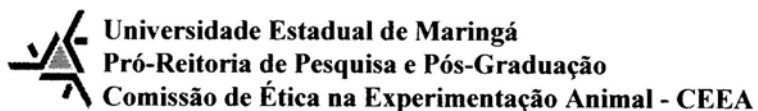
Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. International Committee of Medical Journal Editors. Ann Intern Med 1997, 126:36-47.

Federative Committee on Anatomical Terminology. Terminologia Anatômica, [Tradução para o Português por CTA-SBA]. São Paulo, Manole, 2001, 248p.

International Committee on Veterinary Anatomical Nomenclature. Nomina Anatomica Veterinaria. 4 ed. rev. Zurich, 1994 (Together with Nomina histologica, 2 ed. and Nomina embriologica veterinaria).

APÊNDICE

Aprovação pelo Comitê de Ética da UEM



Ofício-Circular nº 001/2005 - CEEA

Maringá, 2/9/2005

Senhor Pesquisador(a):

Informamos a Vossa Senhoria que o projeto de pesquisa intitulado

Investigação de angiogênese em membro caudal de ratos submetidos à isquemia e tratados com prostaglandina E1

Protocolo nº **054/2003**, encaminhado para apreciação desta Comissão em encontra-se na situação: **Aprovado**

Comunicamos que, conforme Resolução nº 047/2000-CEP, a Comissão de Ética na Experimentação Animal, só poderá emitir o certificado de aprovação, após a apreciação do relatório final da pesquisa. Portanto, aguardamos sua manifestação acerca do referido relatório.

Atenciosamente,



Evanilde Benedito Cecílio
Presidente

Aprovação pelo Comitê de Ética da UNIFESP-EPM



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 30 de abril de 2005
CEP

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) DORIVAL MORESCHI JUNIOR
Disciplina/Departamento: Téc. Op. Cir. Exp./Cirurgia da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Investigação da angiogênese em membro pélvico de ratos sujeitos a isquemia e tratados com prostaglandina E1".

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANEXO A
APROVOU o projeto de pesquisa acima referenciado.

Conforme estabelecido pelo CEP/UNIFESP, são deveres do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Apresentar primeiro relatório parcial em 27/outubro/2004.
3. Apresentar primeiro relatório parcial em 25/abril/2005.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

"Ressaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nestes estudos, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa".

PROTOCOLO I - OPERAÇÃO

DATA: __/__/__. RATO N°: _____ PESO: _____ gramas

INÍCIO: _____ TÉRMINO: _____ DURAÇÃO: _____

ANESTESIA:

DOSE INICIAL: _____ DOSE EXTRA: _____

MONITORIZAÇÃO (ATÉ RECUPERAÇÃO ANESTÉSICA):

	00	05	15	30	45	60	75	90	105	120
* FC										
* FR										
* RO										

(FC = frequência cardíaca; FR = frequência respiratória; RO = reflexo ocular)

INTERCORRÊNCIAS:

PROCEDIMENTO DE ISQUEMIA:

GRUPO/SUBGRUPO: _____

INTERCORRÊNCIAS:

PERÍODO DE OBSERVAÇÃO:

Dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Claudicação														
Infecção pele														
Edema pata														
Necrose pata														
Óbito														

X = Sim

Em branco = Não

Tabela 2 - Contagem do número total de capilares em microscópio óptico, 8 animais de cada grupo, 50 campos por animal, em lâminas coradas pela técnica Hematoxilina-Eosina.

GRUPOS	G I 7	G I 14	G IM 7	G IM 14	G IV 7	G IV 14
	11	46	17	65	13	52
Nº	26	35	12	52	16	32
C	28	24	29	35	14	33
A						
P	22	30	25	54	15	54
I						
L	17	28	17	37	13	41
A						
R	28	26	23	62	23	34
E						
S	21	31	15	65	26	25
	23	22	18	38	17	26